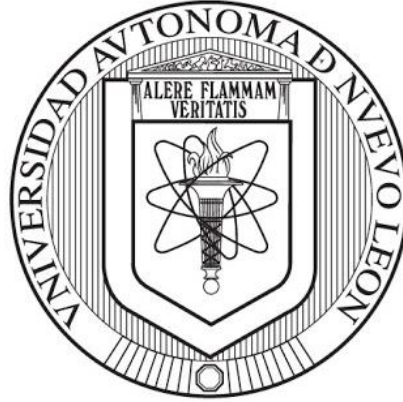


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LAS VELLOSIDADES PLACENTARIAS Y SU
RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE MICOPLASMAS GENITALES EN
PLACENTAS DE PACIENTES CON PARTOS PREMATUROS

POR:

L.B.G. GEMMA GUADALUPE ESTRADA MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con
Orientación en MORFOLOGÍA

Agosto, 2020

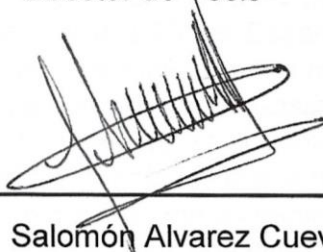
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LAS VELLOSIDADES PLACENTARIAS Y SU
RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE MICOPLASMAS GENITALES EN
PLACENTAS DE PACIENTES CON PARTOS PREMATUROS

Aprobación de la Tesis



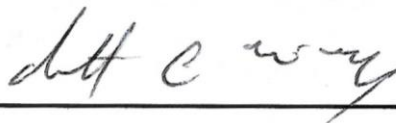
Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha

Director de Tesis



Dr. C. Salomón Álvarez Cuevas

Co-Director de Tesis



Dr. Med. Ivette Miranda Maldonado

Miembro de la Comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su bondad y misericordia infinita, por permitirme estudiar la majestuosidad de sus obras y darme la sabiduría para intentar comprenderlas, por acompañarme en todo momento, guiar mis pasos y ayudarme a seguir por el camino correcto.

A mi madre María Elena Martínez y mi padre Gerardo Estrada por su amor incondicional, su comprensión en cada una de las etapas de mi vida, por sus ánimos para cumplir mis metas y un corazón que me provoca querer ser mejor persona cada día, no existirán suficientes palabras de agradecimiento por tan hermosa crianza y educación que me han dado. A mi Eli por ser esa chispa que me anima día con día y demostrarme que la curiosidad es uno de los mejores comportamientos del ser humano, donde compartirla nos lleva a sacar lo mejor de nosotros mismos, gracias hermana por tu complicidad y apoyo incondicional. Los amo.

A mis dos ejemplos de trabajo y lucha ante cualquier adversidad, mis abuelitas Juanita Gutiérrez y María Elena Raygoza, por demostrarme que aunque sea difícil el panorama, todo siempre saldrá bien. A ti Félix Martínez por enseñarme a ver lo positivo y gracioso en cada situación vivida y a ti Eliseo Estrada por permitirme discutir las maravillas que la naturaleza nos otorga, a ambos por su amor incondicional y esos años maravillosos, siempre estarán en mi corazón y mis pensamientos.

A mi director de tesis el Dr. C. Humberto Rodríguez por su pasión y entrega como profesor, pero aún más importante su preocupación a lo largo de este proyecto, gracias por creer en mí y nunca soltarme, por ayudarme a crecer y darme el ánimo de ver más allá de lo evidente, por su apoyo incondicional, gracias por llevarme de la mano en este difícil pero gratificante camino llamado ciencia.

A mi tutor el Dr. C. Arnulfo Villanueva por su apoyo, ánimos, consejos, asesoría, su amistad y calidad humana. Y a todos mis profesores y compañeros del departamento de Histología por compartir sus conocimientos, experiencias, habilidades, risas y su tiempo durante estos dos años.

A mi familia de Patología, el Dr. C. Salomón Álvarez por creer siempre en mí, confiar en cada una de mis decisiones y guiarme desde antes de comenzar este proyecto, por permitirme e impulsarme en todo momento a seguir creciendo académica y profesionalmente, por su apoyo incondicional y ser más que un jefe para mí; la Q.C.B. Claudia Sánchez por ser y estar en todo momento, por apoyarme, aumentar mi fe y ver cada desafío como un proceso inminente de crecimiento, gracias por tu amor, confianza, tiempo y tu luz; al técnico Martín García por su ayuda en la realización de este proyecto, su apoyo, sus ánimos y su actitud, por sus chistes y tardes de trabajo amenas y la Dra. Med. Ivette Miranda por su apoyo, asesoría y ánimos en la realización de este proyecto.

A todos mis amigos que me apoyaron incondicionalmente durante estos dos años Diana, Nin, Jared, Víctor, Iván, Edgar, Silvia, Lucerito, Bere, Lily, Mariana, Ivonne, César, Carlos, Sr. Arzola, Aarón, Luis, Adriana, Bárbara, Diana, Mauricio, Felipe y muy especialmente a Adrián Leyva, gracias por ser mi amigo, mi equipo de laboratorio, con quien compartir mis alegrías, tristezas, frustraciones, días buenos y otros difíciles, comidas, risas, miedos, conocimientos, dudas, desveladas, seminarios y clases, de tantas cosas positivas que me dio el posgrado fue a un gran amigo como tú y excelente ser humano, gracias por todo.

RESUMEN

Gemma Guadalupe Estrada Martínez
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LAS VELLOSIDADES PLACENTARIAS Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE MICOPLASMAS GENITALES EN PLACENTAS DE PACIENTES CON PARTOS PREMATUROS

Número de páginas:

Área de estudio: Ciencias de la Salud

Propósito y Método de estudio: El parto prematuro es una de las principales causas de muerte neonatal y que tiene serias repercusiones en el desarrollo durante los primeros años de vida de los individuos sobrevivientes. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de agentes causales microbiológicos causantes de abortos y analizar morfométricamente la región coriónica de las placentas de pacientes con partos prematuros con base en su historia clínica en la que no tuvieran algún antecedente patológico ya conocido o de haber sufrido alguna infección durante el tiempo de gestión previo a la labor de parto que permita predecir la aparición de este suceso. Se analizaron placentas que cumplieran con edades gestacionales que las catalogan en 4 categorías: parto prematuro extremo (<28sdg), prematuro medio (28-32sdg), prematuro tardío (32-37sdg) y a término (37-40sdg). De las placentas se obtuvieron 2 cotiledones, uno se congeló a -20°C para posteriormente realizar una extracción de DNA y realizar la detección de micoplasmas genitales por PCR punto final, el segundo cotiledón se fijó en formalina neutra al 10%, se incluyeron en parafina, se obtuvieron secciones de 4µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina, hematoxilina ácida fosfotúngstica, y Wright-Giemsa. Los análisis se realizaron en 10 campos por laminilla teniendo una laminilla por placenta, en 7 placentas por categoría. Los parámetros analizados fueron la presencia/ausencia de micoplasmas genitales y se cuantificaron los parámetros de tamaño de vellosidades, número de vellosidades, número de vellosidades con vasos, cantidad de espacio intervelloso, grosor de la barrera placentaria, área de depósitos de fibrina y células positivas para neutrófilos y linfocitos. Los resultados del análisis se compararon entre las placentas de las diferentes categorías.

Contribuciones y Conclusiones: Los micoplasmas en este estudios demuestran no ser los agentes causales de los partos prematuros, encontrándose presentes tanto en casos como controles. Las vellosidades no muestran una maduración temprana antes de las 37 semanas de gestación, al contrario de esto, presentan inmadurez en etapas tardías de gestación con poco desarrollo de vasos sanguíneos a la periferia, comprometiendo la formación de la barrera placentaria. La respuesta inmune presente en los casos no muestra diferencia significativa comparada con los controles pudiendo ser un factor que inhiba un buen desarrollo estructural de la formación de los árboles vellosos.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. Introducción	
1.1. Embarazo	1
1.1.1. Proceso general de un embarazo a término	1
1.2. Parto Prematuro	3
1.3. Placenta	5
1.3.1. Desarrollo Placentario	6
1.3.1.1. Cara Materna	6
1.3.1.2. Cara Fetal	8
1.3.1.3. Tipos de Vello­sidades	8
1.3.1.4. Vascularización Placentaria	11
2. Antecedentes	
2.1. Placentas de Parto Prematuro	13
2.2. Microbiota placentaria	14
2.2.1. Micoplasmas genitales	16
2.3. Procesos inflamatorios en Placenta	16
2.4. Depósitos de Fibrina	17
3. Justificación	19
4. Hipótesis	20
5. Objetivo General	20
6. Objetivos específicos	20
7. Materiales y Métodos	21

7.1.	Clasificación del Estudio	21
7.2.	Diseño Experimental	21
7.2.1.	Selección de Sujetos de Estudio	21
7.2.2.	Toma de Muestras Placentarias	22
7.3.	Análisis Molecular	23
7.4.	Morfometría	24
7.4.1.	Tinción de Hematoxilina y Eosina	24
7.4.1.1.	Tamaño de Vellosidades	25
7.4.1.2.	Número de Vellosidades	25
7.4.1.3.	Grosor de la Barrera Placentaria	26
7.4.1.4.	Espacio Interveloso	26
7.4.1.5.	Número de Vellosidades Terminales	27
7.4.2.	Tinción de Hematoxilina Fosfotúngstica	28
7.4.2.1.	Depósitos de Fibrina	28
7.4.3.	Tinción de Wright-Giemsa	29
7.4.3.1.	Neutrófilos y Linfocitos	29
7.5.	Análisis Estadístico	30
8.	Resultados	
8.1.	Detección de micoplasmas genitales	31
8.2.	Descripción por grupos con tinción de hematoxilina y eosina	33
8.3.	Tamaño de Vellosidades	38

8.4.	Número de Vello­sidades	39
8.5.	Grosor de la Barrera Placentaria	41
8.6.	Espacio Interveloso	42
8.7.	Número de Vello­sidades Terminales	43
8.8.	Depósitos de Fibrina	45
8.9.	Respuesta inflamatoria	51
8.10.	Resumen de Resultados	57
9.	Discusión	58
10.	Conclusiones	66
11.	Perspectivas	67
12.	Referencias	68
13.	Apéndices	
	Apéndice A. Procesamiento Histotecnológico	76
	Apéndice B. Técnicas de Tinción	77

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Clasificación de Tipos de Vellosidades	8
Tabla 2.	Funciones de las vellosidades	9
Tabla 3.	Grupos de Estudio	22
Tabla 4.	Condiciones Termociclador	23
Tabla 5.	Condiciones de Corrida	24
Tabla 6.	Parámetros morfométricos de las vellosidades de placentas	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Maduración de las vellosidades libres	10
Figura 2. Medición del tamaño de cada vellosidad	25
Figura 3. Conteo de vellosidades por campo	25
Figura 4. Medición de la barrera placentaria	26
Figura 5. Espacio intervelloso esquematizado en color café	27
Figura 6. Esquema de una vellosidad terminal	27
Figura 7. Detección molecular de micoplasmas genitales en placentas	31
Figura 8. Gráfica de porcentajes de muestras positivas por grupo para cada microorganismo	32
Figura 9. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con hematoxilina y eosina en un aumento de 400x perteneciente al Grupo C	33
Figura 10. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con hematoxilina y eosina en un aumento de 400x perteneciente al Grupo PPE	34
Figura 11. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con hematoxilina y eosina en un aumento de 400x perteneciente al Grupo PPM	36

Figura 12.	Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con hematoxilina y eosina en un aumento de 400x perteneciente al Grupo PPT	37
Figura 13.	Grafica de Tamaño de Velloidades	38
Figura 14.	Grafica de Número de Velloidades	39
Figura 15.	Grafica de Grosor de la barrera placentaria	41
Figura 16.	Grafica de Espacio Intervelloso	42
Figura 17.	Grafica Número de Velloidades	43
Figura 18.	Microfotografía de un corte de placenta teñido con PTAH en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo C	45
Figura 19.	Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con PTAH en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo PPE	46
Figura 20.	Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con PTAH en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo PPM	47
Figura 21.	Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con PTAH en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo PPT	48
Figura 22.	Grafica de Depósitos de Fibrina	49
Figura 23.	Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con W-G en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo C	51

Figura 24.	Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con W-G en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo PPE	52
Figura 25.	Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con W-G en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo PPM	53
Figura 26.	Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con W-G en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo PPT	54
Figura 27.	Grafica del Número de Neutrófilos por campo	55
Figura 28.	Grafica del Número de Linfocitos por campo	56

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
<	Menor que
>	Mayor que
≤	Menor o igual que
≥	Mayor o igual que
°C	Grados Celsius
μm	Micrómetro
μm ²	Micrómetro cuadrado
C	Control
C-	Control Negativo
C+	Control Positivo
CAP	Proteínas Asociadas a contracción
g	Gramo
h	Horas
L	Marcador de Peso Molecular
mA	Miliamperes
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
NF-KB	Factor Nuclear kappa-βeta
OMS	Organización Mundial de la Salud

<i>p</i>	Significancia estadística
PPE	Parto Prematuro Extremo
PPM	Parto Prematuro Medio
PPT	Parto Prematuro Tardío
PSF	Factor de corte y empalme asociado a la proteína polipirimidina
PTAH	Hematoxilina Ácida Fosfotúngstica
SDG	Semanas de gestación
V	Volts
W-G	Wright-Giemsa

Proyecto realizado en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en colaboración con el Departamento de Histología y el Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina y el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Embarazo

1.1.1. Proceso general de un embarazo a término

El embarazo es definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como los nueve meses durante los cuales el individuo se desarrolla en el útero materno, teniendo una duración de entre 38 y 40 semanas de gestación (SDG) y que culmina con la labor de parto (Organización Mundial de la Salud, 2020).

El desarrollo del ser humano es un proceso continuo que comienza cuando un espermatozoide fertiliza un ovocito, dando lugar a procesos celulares como división, crecimiento, diferenciación, muerte programada y reorganización para que de esta manera se transforme el ovocito fecundado en una célula altamente especializada y totipotencial, la cual ahora será llamada cigoto y que dará lugar a un ser humano multicelular. (Moore et al., 2013). Así, al finalizar el proceso de desarrollo dará lugar a la labor de parto, que permitirá la expulsión del individuo viable fuera del útero. Para que se pueda llevar a cabo este proceso, es necesario la formación de una cascada de señalización que lo permita, comenzando con una modificación en la actividad uterina.

El embarazo, es un proceso relacionado con procesos de inflamación debido a distintos estímulos, con la posibilidad de iniciar la labor de parto de forma prematura como se mencionó anteriormente. Durante la inflamación

hay marcadores que evidencian esta patología, como lo son las citocinas, las cuales activan las membranas fetales y maternas, desencadenando en la producción de diversos factores como prostaglandinas, metaloproteinasas, leucocitos y receptores de oxitocina(Roberto Romero et al., 1989). Por lo que después de este fenómeno, moléculas de carácter lipídico, por mencionar alguna de estas moléculas, como las prostaglandinas, modifican el cuello uterino, desencadenando el trabajo de parto.

Durante la labor de parto normal la actividad uterina se divide en 4 fases, quiescencia, activación, estimulación e involución. Durante la fase de quiescencia la progesterona, secretada por el ovario y la placenta, interacciona con su receptor, en el citoplasma de las células del miometrio, causando que el complejo se transloque al núcleo, en el núcleo actuará como factor de transcripción uniéndose al promotor del gen ZEB1, la expresión de ZEB1 está implicado en la represión de factores de transcripción que actúan sobre genes que codifican para proteínas asociadas a la contracción (CAP), como la Conexina 43, esto a través de un co-regulador llamado Factor de corte y empalme asociado a la proteína polipirimidina de unión al tracto (PSF), adyacente a este proceso, el complejo progesterona-receptor de la progesterona traslocado al núcleo, activa la sobreexpresión de la caspasa 3, enzima que degrada la arquitectura contráctil de la célula, de esta manera, el resultado de esta cascada de señalización desencadena en un útero quiescente, que permite el estiramiento y crecimiento del miometrio durante el desarrollo del feto. La activación del inicio de la labor de parto, durante el inicio de las contracciones, se ve inducido cuando las células blancas invaden

tejidos maternos, placenta y membranas fetales incluso en la ausencia de alguna infección. Mastocitos, macrófagos y neutrófilos se ven implicados en el comienzo de un proceso inflamatorio, siendo la proteína surfactante A, la molécula que inicia esta cascada de señalización, el incremento en la concentración de esta proteína, activa a los macrófagos en el líquido amniótico, promoviendo su migración hacia el útero donde inicia el proceso de inflamación, a través de la producción de citocinas y quimiosinas, una vez elevada la producción de citocinas, estas activan NF-KB, que se transloca al núcleo de la células del miometrio, uniéndose a la región promotora de los genes CAP, activando su expresión, NF-KB también se une a al complejo progesterona-receptor de la progesterona, impidiendo su unión al DNA, disminuyendo la expresión del represor ZEB1 elevando la expresión de CAPs y disminuyendo los niveles de expresión de la caspasa 3, así mismo el inicio de la contracción provoca un descenso en la concentración de PSF, que provoca una disminución de la concentración de la progesterona. De esta manera inicia la contracción de las células del miometrio (Mendelson, 2009).

1.2. Parto Prematuro

El parto prematuro es definido también por la OMS como “el nacimiento del bebé vivo antes de que se completen las 37 semanas de gestación”, dividiéndose en varias categorías dependiendo de la edad gestacional: el parto prematuro extremo que considera menos de los 28 semanas de gestación, parto prematuro medio que va de las 28 a las 32 semanas de

gestación y el parto prematuro tardío que va de las 32 a las 37 semanas de gestación.

El parto prematuro es un problema de salud público, siendo la mayor causa de morbilidad y mortalidad entre los infantes y la mayor parte de los sobrevivientes tienen una pobre calidad de vida generando un costo alto para sus familias y el sistema de salud pública (Ananth & Vintzileos, 2006). Reportes de estudios previos indican que los partos prematuros espontáneos representan aproximadamente el 75% de los partos prematuros que ocurren con algún fallo durante el embarazo (Kramer, 2000). La proporción de partos prematuros se ha ido incrementando en las últimas décadas y se prevé que continúen en aumento, debido a factores como el riesgo durante el parto de mujeres de edad avanzada, con condiciones médicas crónicas, uso de tratamientos de fertilidad y el aumento en el uso cesáreas programadas, siendo el parto prematuro la principal causa de muerte en niños menores de 5 años y responsable de aproximadamente 1 millón de muertes en el 2015 (Liu et al., 2012).

Se han asociado algunos factores de riesgo a partos prematuros, pero las causas específicas aún no están bien fundamentadas. Dentro de los parámetros clínicos a evaluar como factores de riesgo asociados al parto pretérmino se encuentran las condiciones médicas de la madre catalogadas como enfermedades crónicas: asma, depresión, desórdenes tiroideos, diabetes e hipertensión. Así mismo, se encuentran las enfermedades agudas: micosis, infecciones del tracto genitourinario, listeriosis, infecciones gastrointestinales, infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana y/o

SIDA, diabetes gestacional, hipertensión gestacional, preeclampsia y polihidramnios. Además, se han documentado las condiciones obstétricas como placenta previa, desprendimiento de placenta, anormalidades uterinas. También se han descrito como factores de riesgo a las variables sociodemográficas como la edad materna al parto, estado civil, nivel escolar y lugar de residencia (urbano o rural), indicadores previos de salud como hospitalizaciones, visitas a emergencias de salud, consultas ginecológicas y obstétricas, visitas prenatales, número de medicamentos utilizados, tiempo en meses del embarazo previo, aborto o pérdida fetal previo (van den Broek et al., 2014)

1.3. Placenta

La placenta es un órgano fetomaterno que en conjunto con las membranas fetales (corion, amnios, vesícula umbilical y la alantoides) permiten separar el feto de los tejidos adyacentes en el útero, como lo es el endometrio (mucosa que se encarga de revestir la pared uterina). La placenta junto con el cordón umbilical conforma un sistema para el transporte de sustancias de la madre al feto, mientras que los materiales de desecho pasarán también a través de este sistema, desde la sangre fetal a la sangre materna (Moore et al., 2013). Las funciones principales de todo este conjunto de tejido son la protección, nutrición, respiración, excreción de productos de desecho y producción de hormonas. Posterior al parto esta será expulsada del útero al rompimiento de las membranas fetales, durante la etapa llamada puerperio, específicamente en el postparto inmediato aproximadamente media hora

después de la expulsión del individuo, y que al momento se debe realizar la examinación de la placenta, que es necesaria para poder comprender las causas de un parto prematuro o muerte perinatal (Benirschke et al., 2006).

1.3.1. Desarrollo Placentario

Una placenta a término, en aproximadamente 90% de los casos de un parto normal exitoso, se presenta en una forma de disco, redondo u ovalado de un diámetro de 22cm, un grosor promedio de 2.5cm y un peso de 500g aproximadamente (Torpin, 1969).

Esta comienza su desarrollo desde la cuarta semana de gestación o primer mes, donde el mesodermo extraembrionario ya penetra en las vellosidades troncales, dirigiéndose a la placa decidua; mientras que para el cuarto mes o la semana 16 ya se encuentran bien desarrolladas las vellosidades pequeñas y la pared de los capilares ya está en contacto directo con el sincitio, formando la membrana placentaria y adelgazando su grosor, lo que permitirá un adecuado transporte de sustancias y metabolitos (Sadler, 2012)

1.3.1.1. Cara Materna

La placenta presenta dos partes bien definidas, una de ellas es la cara materna, la cual estará constituida por la decidua basal, la decidua es el endometrio uterino de la madre, esta es una capa funcional del endometrio que se separa del resto del útero al finalizar el parto y que se divide en tres partes:

- Decidua Basal: es la parte más profunda de la decidua y que representa la cara materna
- Decidua Capsular: parte más superficial de la decidua que cubre el producto de la concepción
- Decidua Parietal: Decidua restante (Sadler, 2012)

Al inicio del cuarto mes la decidua permitirá formar diversos tabiques deciduales que se proyectarán dentro de los espacios intervelllosos sin alcanzar la placa coriónica que estará en la cara fetal de la placenta, estos tabiques estarán formados de tejido materno pero recubiertos de células sincitiales, formando los árboles vellosos, que permitirán separar la sangre materna de la fetal, de esta manera generará la formación de compartimentos llamados cotiledones. Al final del cuarto mes o la semana 16 estará sustituida casi completamente por la pared fetal de la placenta. A su observación macroscópica la cara materna es opaca debido al proceso degenerativo laminar junto con la zona de unión que permite que se pueda separar la placenta del útero, esta zona de unión permite que a su vez la decidua basal se subdivide en placa basal y cama placentaria, donde esta última quedará unida al útero (Kaufmann & Scheffen, 1992).

1.3.1.2. Cara Fetal

La cara fetal es la segunda cara bien definida de la placenta que procede del saco coriónico, la cual es la membrana fetal más externa. Se encuentra de frente a la cavidad amniótica y que a su observación macroscópica tiene una apariencia brillante debido a la superficie epitelial intacta de la superficie del amnios. De esta convergerán grandes arterias y venas, también llamados vasos coriónicos, hacia el cordón umbilical (Kaufmann & Scheffen, 1992).

1.3.1.3. Tipos de Vellosidades

La ramificación de los árboles vellosos permiten la formación del parénquima placentario que está representado por las vellosidades coriales, las cuales son proyecciones minúsculas de tejido placentario que comparten la composición genética del bebé y permitirán el intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto, estas se subdividen en varios tipos dependiendo del calibre, estructura estromal, estructura de los vasos y su posición dentro del árbol veloso:

Tabla 1. Clasificación de Tipos de Vellosidades

Mesenquimales	Son las más primitivas, sólo se encuentran al inicio del embarazo, donde proliferan las zonas vellosas y de ramificación
---------------	--

Troncales	Caracterizadas por abundante estroma fibroso, presencia de arterias, venas o arteriolas y vénulas
Inmaduras Intermedias	Son bulbosas, periféricas (se encuentran entre el tronco y el inicio de sus ramificaciones)
Maduras Intermedias	Más largas y delgadas, con ramificaciones periféricas, carentes de vasos
Terminales	Ramificaciones en forma de uva u ovaladas con un alto grado de capilarización y sinusoides muy dilatados, donde ocurre el principal intercambio feto-maternal

(Benirschke et al., 2006)

Y que se verá influenciado por el nivel de maduración de cada una de las vellosidades, el estadio en el que se encuentren. Así mismo sus funciones serán distintas:

Tabla 2. Funciones de las vellosidades

Mesenquimales	Principalmente permite la proliferación de las vellosidades, asimismo contiene sitios que permiten el intercambio materno-fetal y tiene actividad endócrina
Troncales	Dar soporte mecánico a los árboles vellosos (placentones), con actividad endócrina y capilar muy baja, sin embargo provee un sistema regulado para la circulación materna en el espacio intervilloso

Inmaduras Intermedias	Principal sitio de intercambio los primeros dos meses de gestación
Maduras Intermedias	Permite la formación de las vellosidades terminales, donde predominan los sitios para la producción de hormonas, participando también en la vaso regulación y la distribución de la sangre intervellosa.
Terminales	Permite la forma más apropiada para la difusión materno-fetal

(Benirschke et al., 2006)

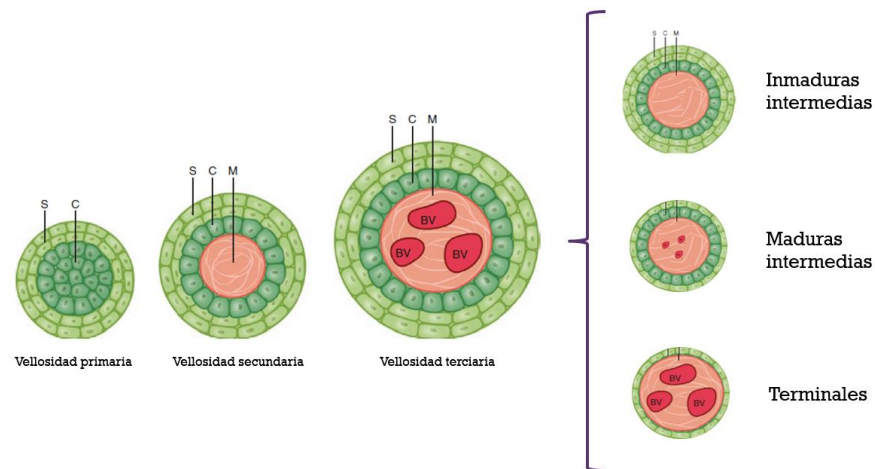


Fig. 1. Maduración de las vellosidades libres

1.3.1.4. Vascularización Placentaria

La placenta es el único órgano temporal que recibe sangre de dos sistemas distintos, que son el materno y el fetal a través de dos sistemas circulatorios separados:

1. Materno-placentario: también llamado uteroplacentario
2. Fetoplacentario

Este comienza con la circulación uteroplacentaria donde se da el flujo de sangre materna hacia el espacio intervilloso a través de las arterias espirales deciduales, provocando el intercambio de oxígeno y nutrientes. Posteriormente se da el flujo de la sangre desoxigenada y sin nutrientes de vuelta a la circulación materna. La circulación fetoplacentaria permite que las arterias umbilicales lleven la sangre fetal desoxigenada y sin nutrientes del feto a los núcleos vellosos y que después del intercambio de oxígeno y nutrientes las venas umbilicales lleven la sangre fresca y oxigenada de vuelta al feto.

Para que se pueda llevar a cabo esto, deben ocurrir dos procesos que permitan el surgimiento de los vasos sanguíneos, como lo son la vasculogénesis y angiogénesis, ocurriendo tres procesos durante la maduración placentaria:

1. Paso 1: Inicio de la vasculogénesis a través de la diferenciación de los citotrofoblastos inducidos por células madre hemangiogénicas, regulada esta diferenciación por el factor de crecimiento endotelial vascular de manera parácrina. Se dará entre los días 18 a 25 después de la concepción durante la formación de vellosidades mesenquimales hacia vellosidades maduras intermedias.
2. Paso 2: Proceso llamado de Activación donde se da la formación de una red prevascular, también llamado Angiogénesis I,

mediante la secreción de factores de crecimiento producidos por células del citotrofoblasto y células de Hofbauer. Los primeros tubos endoteliales estarán formados entre el día 21 y 32 después de la concepción

3. Paso 3: Proceso llamado de Remodelación o Angiogénesis II, donde ocurrirá un proceso de diferenciación de las células perivasculares (células tipo pericitos y miofibroblastos) que permitirán formar los vasos contráctiles. Por lo tanto la vascularización fetal será el resultado de la formación de novo de capilares para el día 32 después de la concepción.

A partir de este instante hasta la semana 25 de gestación se llevará a cabo la formación de la red de capilares, prevaleciendo principalmente la angiogénesis en las ramificaciones de las vellosidades terminales, permitiendo la formación de la barrera placentaria que permita un intercambio exitoso de nutrientes y oxígeno entre el feto y la madre (Wang, 2017).

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1. Placentas de Parto Prematuro

Diversos grupos de trabajo han reportado cambios histológicos que proyectan la patología de diversos órganos justificando enfermedades de etiología desconocida, con el fin de tener una mayor comprensión de los cambios no sólo a nivel fisiológico y funcional, sino también estructurales, mediante un análisis histopatológico encontraron que la placenta en el parto prematuro, presenta cambios por procesos infecciosos definidos como corioamnonitis histológica, funisitis histológica, siendo primordialmente encontrado, en aquellas placentas de parto prematuro, con una maduración acelerada de las vellosidades a semanas tempranas de gestación, donde placenta de 32 SGD (parto prematuro) muestra una apariencia de 40 SGD (parto a término), y siendo clínicamente diagnosticada como insuficiencia placentaria (disminución de intercambio de nutrientes y oxígeno) sin mencionar su relación directa con diagnósticos previamente ya conocidos como la preeclampsia y diabetes. (Morgan, 2016)

Así mismo los principales estudios morfométricos, relacionan los altos índices de una baja cantidad de vellosidades terminales y poca superficie vellosa principalmente en pacientes previamente diagnosticadas con preeclampsia y diabetes, demostrando también una restricción del crecimiento fetal, observándose en las placentas una amplia cantidad de espacio intervelloso (Odibo et al., 2011) .

Mediante el diagnóstico de hemorragia vaginal, y anormalidades en el ritmo cardíaco fetal, la histología placentaria muestra principalmente lesiones disruptivas como ruptura de vasos y hemorragia feto-maternal, lesiones obstructivas como infarto, vasculopatía decidual, deposición masiva de fibrina, edema difuso vellosos y vasculopatías trombóticas fetales, así mismo lesiones adaptativas como corioniosis y anomalías en las ramificaciones vellosas (Avagliano et al., 2015).

La examinación macroscópica de la placenta, en los casos de un parto prematuro, las placentas se encuentran dentro de los rangos establecidos en cuanto al peso promedio, sin embargo presenta un coeficiente placentario alto, definido por el peso de la placenta y del feto al nacer, ya que los niños presentan una restricción en el crecimiento, viendo por encima de otros factores como diabetes, anemia, embarazo gemelar o post-maduración placentaria que son los principales factores relacionados a un crecimiento restringido. (Raghunath et al., 2011)

2.2. Microbiota placentaria

Ya se ha establecido previamente la integridad de una placenta sana y su rol crítico en el desarrollo embrionario y fetal y que a través de estudios morfológicos y moleculares se ha detectado la presencia de microorganismos que no sólo son capaces de infectarla provocando un daño, sino que cumplen un rol en las diferentes regiones placentarias (Cao et al., 2014).

La microbiota placentaria, a diferencia de la microbiota intestinal, muestra una diversidad limitada, provocando una interacción previa a la expulsión del feto, que puede presentar variabilidad entre los individuos, pero de manera general se verá contribuida por microbiota del lumen intestinal compartida vía sangre a través de las células dendríticas maternas capaces de internalizarse a través de uniones intercelulares débiles, microbiota vaginal debido a la diseminación a través del flujo sanguíneo durante el embarazo, así como microbiota oral debido a uniones intercelulares débiles que permiten la transferencia de bacterias a circulación sanguínea y que son capaces de crecer en la placenta (Pelzer et al., 2016) .

Esa microbiota está integrada por microorganismos de distintos filos, siendo el más abundante los microorganismos pertenecientes al filo proteobacteria, seguido por aquellos pertenecientes al filo actinobacteria, firmicutes, bacterioidetes, cianobacteria y en menos proporción los del filo tenericutes y verrucomicrobia, sin embargo, no se menciona una microbiota específica de gestaciones pretérmino (Aagaard et al., 2014).

Los principales estudios se han centrado en el análisis histopatológico de la placa basal y por consiguiente es donde se muestrea con el fin de describir el nicho ecológico de esa principal área de la placenta ya que se encuentra unida directamente al útero materno, sin embargo, se menciona que es posible que las diferentes regiones presenten microbiota distinta, debido a los componentes de cada una de estas (Cao et al., 2014), siendo los principalmente reportados los micoplasmas genitales en el caso de partos prematuros (Pararas et al., 2006).

2.2.1. Micoplasmas genitales

Son diversos los estudios que han reportado la presencia de micoplasmas relacionados a una interrupción del embarazo, yendo desde la producción de abortos a partir de la bacteremias causada por estos agentes infecciosos, como *Mycoplasma hominis*, y que normalmente las infecciones urogenitales por este agente se ven inadvertidas debido a un pobre sistema de detección (Posse et al., 2017), pero que se ha venido reportando desde hace tiempo con una clara correlación clínica no sólo de *Mycoplasma hominis*, sino también de *Ureaplasma urealyticum*. Esta correlación sólo se ha demostrado a través de cultivos celulares de cordón umbilical, encontrándose en un máximo de 3.6% la co-infección de estos micoplasmas en abortos espontáneos y un 5.4% para *Mycoplasma hominis* y 22.4% para *Ureaplasma urealyticum* (Embree et al., 1980).

Así mismo estos microorganismos sólo se han relacionado directamente a un proceso infeccioso de corioamnionitis directamente relacionado a parto prematuro, mas no en infección de los árboles vellosos o placentones u otra región de la placenta (Stein et al., 1994).

2.3. Procesos inflamatorios de la placenta

Como se mencionó en la introducción, el inicio del parto se caracteriza por la acción de distintas moléculas que aumentarán, entre otras actividades, la respuesta inmune, principalmente células blancas que invadirán tejidos maternos, placenta y membranas fetales aun y en la ausencia de una infección, sin embargo, es posible que un proceso inflamatorio durante el

embarazo sea capaz de no sólo atacar una infección, sino de provocar el inicio de la labor de parto de manera indirecta (Farina & Winkelman, 2005).

En pacientes principalmente de parto prematuro extremo, se diagnosticó corioamnionitis severa que en el análisis histológico se evidenció con la presencia de lesiones inflamatorias relacionadas con una malperfusión vascular materna, sin embargo, esta malperfusión se vio aumentada en los partos prematuros medio y tardío, siendo entonces los más propensos a lesiones por inflamación aquellos de menos semanas de gestación. (Nijman et al., 2016)

Mientras que otros reportes lo asocian no sólo a un efecto en la malperfusión, sino también a un pobre crecimiento neonatal evidenciando que las lesiones podrían estar causando una restricción de nutrientes que lleve a un buen desarrollo del feto. (Mestan et al., 2010)

Así mismo también se reporta que estas lesiones están principalmente relacionadas a diagnósticos placentarios como preeclampsia e infección de líquido amniótico, en el caso de la malperfusión placentaria y las lesiones inflamatorias a diagnósticos como inflamación linfocítica y del líquido amniótico, y que siempre estarán relacionadas una de la otra tanto por su causa, como por su diagnóstico (Chisholm et al., 2018).

2.4. Depósitos de Fibrina

Los procesos inflamatorios antes mencionados no sólo van a repercutir en la aparición de lesiones y en conjunto lleven a una pobre irrigación sanguínea,

sino que dependiendo de la microbiota y los procesos de remodelación de vasos, también se pueden asociar a otras patologías o permiten su desencadenamiento.

En un modelo murino, se demostró que la exposición a la inflamación uterina permite pronosticar un daño fetal a través del análisis placentario haciendo una medición indirecta de procesos de hipercoagulación reflejados por un aumento en los depósitos de fibrina, y que al aumento de esta hipercoagulación en la placenta provoca malperfusión placentaria y resistencia de los vasos fetales pudiendo llegar a desarrollar disfunción cardíaca, así como daño cerebral en el neonato, viéndose principalmente aumentado en el parto prematuro. (Eloundou et al., 2019)

Otros reportes, también han mencionado que estos depósitos se encuentran principalmente en vellosidades troncales, al ser reemplazado el epitelio trofoblástico conforme avanzan las semanas de gestación (Nelson et al., 1990) sin embargo un aumento en vellosidades no troncales sugiere una pobre vascularización capilar (Kramann et al., 2013)

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

Debido a que se reporta un aumento en la incidencia mundial de partos prematuros, y siendo el principal motivo de muerte en niños durante los primeros 5 años de vida, es de suma importancia analizar la acción de agentes infecciosos sobre la morfología placentaria. Principalmente, evaluar la presencia de aquellos microorganismos relacionados a partos prematuros, como los micoplasmas genitales. Asimismo, cuantificar los cambios morfométricos en las vellosidades placentarias de partos prematuros y que no se encuentran reportados hasta el momento, con el fin de analizar su correlación, lo que nos permitirá predecir cómo influye en el parto prematuro y poder establecer un método diagnóstico que prediga su ocurrencia.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

La presencia de micoplasmas genitales está relacionada a cambios histológicos que influyen en las vellosidades placentarias de pacientes con partos prematuros

CAPÍTULO 5

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de micoplasmas genitales y su relación a cambios histológicos en las vellosidades placentarias de pacientes con partos prematuros

CAPÍTULO 6

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1. Determinar la presencia de micoplasmas genitales asociados a la placenta de pacientes de parto prematuro

Objetivo 2. Evaluar la histología de las vellosidades placentarias de pacientes con parto prematuro.

Objetivo 3. Determinar la presencia de células inflamatorias en tejido placentario.

CAPÍTULO 7

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Clasificación del Estudio

Estudio epidemiológico, observacional, retrospectivo y transversal

7.2. Diseño Experimental

7.2.1. Selección de Sujetos de Estudio

En un proyecto previo se obtuvieron cotiledones de placentas de mujeres parturientas con parto prematuro, del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” respetando los siguientes criterios:

1. Criterios de inclusión:

- Mujeres con productos nacidos prematuramente después de la semana 20 de gestación y antes de la semana 37.
- Obtención de consentimiento informado.
- Historial clínico que no reporte infecciones previas o patología placentaria diagnosticada.

2. Criterios de exclusión:

- No obtención de consentimiento informado verbal.
- Mujeres con incapacidad mental para otorgarlo.

3. Criterios de eliminación:

- Solicitud de la paciente de retirarse del estudio.
- Falta o mala calidad del material biológico para los estudios microbiológicos.
- Falta de información clínica.

Así mismo se seleccionaron muestras pareadas para cada uno de los grupos, siendo los grupos cada una de las categorías del parto prematuro y un grupo de parto a término, con una n=7 por cada grupo.

Tabla 3. Grupos de estudio

C	PPE	PPM	PPT
37 – 40 SDG	≤ 28 SDG	28 – 32 SDG	32 – 37 SDG

7.2.2. Toma de Muestras Placentarias

Se obtuvieron dos cotiledones de la región más periférica de cada placenta de parto prematuro, que posteriormente uno de ellos se colocó en un tubo cónico de 50mL para resguardarse a -20°C para el análisis molecular y el segundo cotiledón fue fijado en formalina neutra al 10%, se incluyeron en parafina y se cortaron secciones en serie de 4µm de grosor. Estas secciones fueron desparafinadas a 65°C y posteriormente en xileno, hasta ser hidratadas en concentraciones decrecientes de alcohol para pasar finalmente a agua destilada.

7.3. Análisis Molecular

Para evaluar la presencia de micoplasmas, se realizó la extracción de DNA genómico de la porción media de cada cotiledón (resguardado a -20°C) por muestra, por la técnica de fenol-cloroformo para posteriormente llevar a cabo una PCR punto final para la detección de cada uno de los micoplasmas de interés así como un control interno para beta globina, ya que los micoplasmas se caracterizan por ser de comportamiento intracelular, utilizando las siguientes condiciones para la obtención de productos:

Tabla 4. Condiciones Termociclador

	Desnaturalización inicial	No. De Ciclos	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Elongación Final
β-Globina (268 pb)	94°C x 5min	30	94°C x 1min	53°C x 1min	70°C x 1min	70°C x 10min
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (429 pb)	94°C x 5min	40	95°C x 20seg	62°C x 1min	72°C x 1min	72°C x 5min
<i>Mycoplasma genitalium</i> (281 pb)	95°C x 5min	35	95°C x 1min	65°C x 1min	72°C x 1min	72°C x 6min
<i>Mycoplasma hominis</i> (334 pb)	95°C x 10min	40	95°C x 25seg	62°C x 62seg	72°C x 1min	72°C x 5min

Posteriormente los productos se corrieron geles de agarosa con las siguientes condiciones de corrida:

Tabla 5. Condiciones de corrida

Gel de agarosa	Buffer de corrida	mA	V	Tiempo
1.5%	TBE 0.5%	261	140	2hrs

7.4. Morfometría

7.4.1. Tinción de Hematoxilina y Eosina

Para el análisis morfométrico se utilizaron las secciones hidratadas para posteriormente teñirlas con la tinción de rutina o tinción de hematoxilina y eosina, siguiendo los pasos descritos en el Apéndice B.

Se seleccionaron al azar 10 campos por cada sección de muestra/placenta previamente cortada, para analizar en total 70 campos por grupo, primero se tomó foto de cada uno de los campos con un microscopio de campo claro Primo Star (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemania) para obtener imágenes de alta resolución a color de las vellosidades de cada placenta, en un aumento de 400x, utilizando una cámara Axio-Cam ICc1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) vinculada al software Zen lite 2011 (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Finalmente se hizo la medición de cada uno de los parámetros morfométricos, con el paquete de procesamiento de imágenes de código abierto Fiji basado en ImageJ (National Institutes of Health)

7.4.1.1. Tamaño de vellosidades

Para medir el tamaño de las vellosidades, se midió el diámetro mayor y diámetro menor de cada una de las vellosidades encontradas por campo, como se muestra en la figura 2, para posteriormente realizar el cálculo del área de cada vellosidad en μm^2 .



Fig. 2 Medición del tamaño de cada vellosidad

7.4.1.2. Número de Vellosidades

Como segundo paso se contó el número de vellosidades por campo, en 10 campos totales por muestra.



Fig. 3. Conteo de vellosidades por campo

7.4.1.3. Grosor de la Barrera Placentaria

Para la medición del grosor de la barrera placentaria, se tomó como punto de inicio la superficie apical del epitelio sincitiotrofoblástico hasta la membrana basal del endotelio de los capilares periféricos en cada una de las vellosidades, como se demuestra en la figura 4.

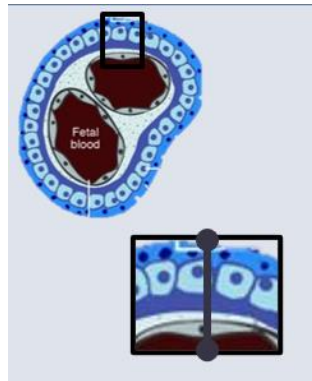


Fig. 4. Medición de la barrera placentaria

7.4.1.4. Espacio Intervelloso

La medición del espacio intervelloso se hizo a través del plugin de Fiji “Deconvolución de Color” utilizando como tinción HyE, separando los 3 canales, tomando el de la corrección de color rosa, que se adaptaba a la tinción de todos los elementos excepto del espacio intervelloso, para que se calcule el área de las zonas no teñidas, que esquematizado en la figura 5, pertenece a todo aquellos de color café.



Fig. 5. Espacio intervilloso esquematizado en color café

7.4.1.5. Número de Vellosidades Terminales

Para cuantificar el número de vellosidades terminales, se tomó como parámetro lo descrito en la sección 1.3.1.3. referente a las vellosidades terminales que se presentan como vellosidades libres con pérdida del citotrofoblasto, un epitelio delgado de sincitiotrofoblasto que encapsula los capilares orientados a la periferia, y un centro velloso formado principalmente de fibras colágenas o hialinizado, así como la presencia de nódulos sincitiales en el epitelio sincitiotrofoblástico, como se muestra en la figura 6.

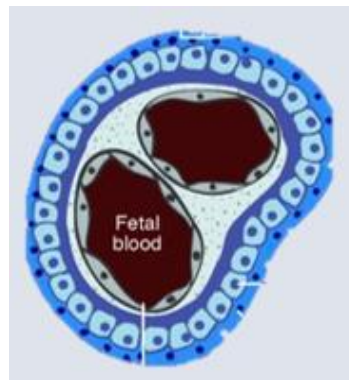


Fig. 6. Esquema de una vellosidad terminal

7.4.2. Tinción de Hematoxilina Fosfotúngstica (PTAH)

Para el análisis morfométrico se utilizaron las secciones hidratadas para posteriormente teñirlas con la tinción de hematoxilina fosfotúngstica, siguiendo los pasos descritos en el Apéndice B.

Se seleccionaron al azar 10 campos por cada sección de muestra/placenta previamente cortada, para analizar en total 70 campos por grupo, primero se tomó foto de cada uno de los campos con un microscopio de campo claro Primo Star (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemania) para obtener imágenes de alta resolución a color de las vellosidades de cada placenta, en un aumento de 400x, utilizando una cámara Axio-Cam ICc1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) vinculada al software Zen lite 2011 (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Finalmente se hizo la medición de cada uno de los parámetros morfométricos, con el paquete de procesamiento de imágenes de código abierto Fiji basado en ImageJ (National Institutes of Health)

7.4.2.1. Depósitos de Fibrina

Para la medición del área que comprende los depósitos de fibrina, encontrados en las vellosidades libres y troncales de la placenta, se hizo a través del plugin de Fiji “Deconvolución de Color” utilizando como tinción PAS (ya que el software no cuenta con la tinción base de PTAH, sin embargo se adapta a los tonos de la tinción obtenida, separando los 3 canales, tomando el de la corrección

de color morado, que se adaptaba a la tinción sólo de los depósitos de fibrina, descartando los núcleos, calculando el área de las zonas teñidas en μm^2 .

7.4.3. Tinción de Wright-Giemsa

Para el análisis morfométrico se utilizaron las secciones hidratadas para posteriormente teñirlas con la tinción de Wright-Giemsa, siguiendo los pasos descritos en el Apéndice B.

Se seleccionaron al azar 10 campos por cada sección de muestra/placenta previamente cortada, para analizar en total 70 campos por grupo, primero se tomó foto de cada uno de los campos con un microscopio de campo claro Primo Star (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemania) para obtener imágenes de alta resolución a color de las vellosidades de cada placenta, en un aumento de 400x, utilizando una cámara Axio-Cam ICc1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) vinculada al software Zen lite 2011 (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

7.4.3.1. Neutrófilos y Linfocitos

Se contabilizó el número de neutrófilos y linfocitos por campo, específicamente en zonas de vellosidades troncales y libres.

7.5. Análisis Estadístico

Todos los resultados fueron recabados en hojas de Excel versión 2016 (Microsoft Corp. Redmon, WA, EUA) y analizados con el programa GraphPad Prism 7 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA)

El análisis estadístico propuesto, fue el uso del test U de Mann Whitney, para determinar significancia estadística ($p \leq 0.05$), debido a que la N propuesta es pequeña (<30), y también se pareó de acuerdo a los grupos de estudio, así como un historial clínico de la paciente sana, sin historial de infecciones o uso de antibióticos, también descartar aquellas pacientes positivas a consumo de sustancias nocivas (alcohol, drogas, tabaco), con diagnóstico positivo para diabetes o preeclampsia y la presencia de una forma anormal de la placenta, lesiones, alteraciones circulatorias, inflamación o tumores placentarios.

Para posteriormente realizar un análisis post hoc con Bonferroni y evaluar si existe diferencia significativa ($p \leq 0.0125$) entre los grupos.

CAPÍTULO 8

RESULTADOS

8.1. Detección de micoplasmas genitales

Se realizó la detección de micoplasma genitales en las 28 muestras de placentas que pertenecen a los 4 grupos de estudio, con el fin de conocer si la presencia de estos microorganismos se correlacionaba con el parto prematuro en las distintas categorías establecidas, obteniendo la figura 7.

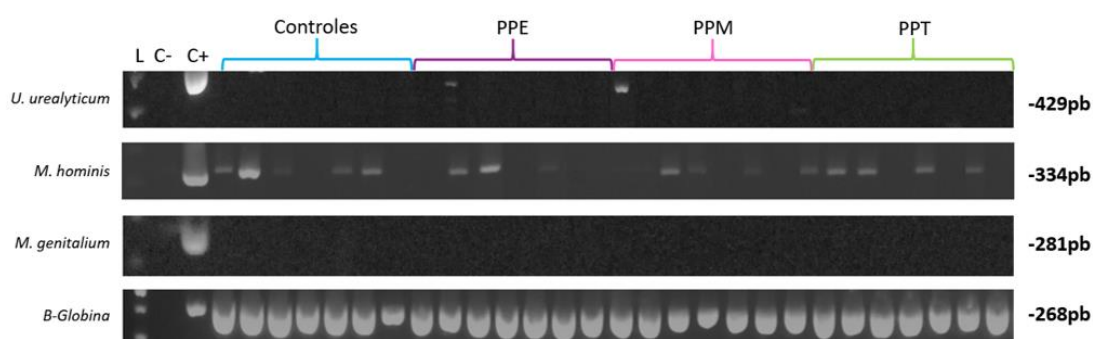


Fig. 7. Detección molecular de micoplasmas genitales en placenta. (L: Marcador de peso molecular, C-: Control negativo, C+ Control positivo, Controles: Grupo de placentas de parto a término, PPE: Parto prematuro extremo, PPM: Parto prematuro medio, PPT: Parto prematuro tardío)

Se puede observar en la primera fila una banda de 429 pb perteneciente al producto de PCR de *U. urealyticum*, en una muestra del grupo de PPE y en otra del grupo PPM, evidenciando la ausencia de este microorganismo en el grupo C y grupo PPT y que dentro de la figura 8 observamos un porcentaje del 14.3% de las placentas positivas para este microorganismo en los grupos PPE y PPM. En

la segunda fila se observan las muestras positivas para *M. hominis* encontrándose en los 4 grupos de estudio y que basándose en el número de muestras positivas el grupo C y PPM tienen un porcentaje de 71.4, mientras que el grupo PPE tiene un 42.9% y el grupo PPT un 57.1% de muestras positivas. En el tercer carril no se observa ninguna banda, por lo que ninguna muestra fue positiva para *M. genitalium*. Por último la fila 4 muestras las bandas positivas para β -globina, utilizada como control interno, ya que las bacterias analizadas son microorganismos intracelulares

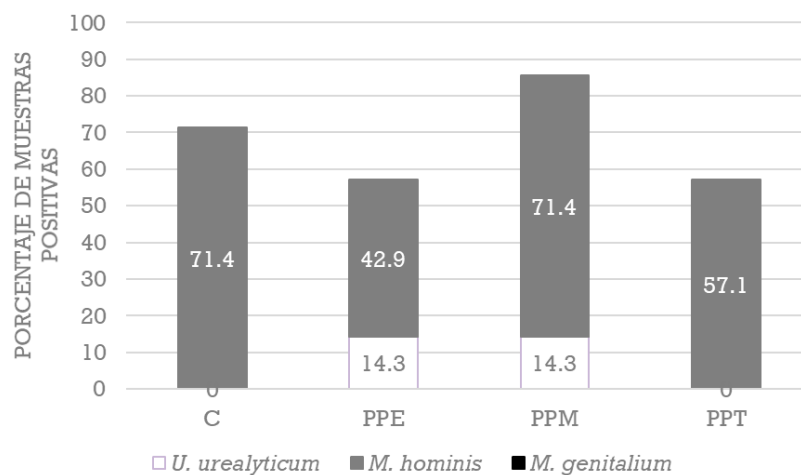


Fig. 8. Gráfica de porcentajes de muestras positivas por grupo para cada microorganismos

La figura 8 resume el porcentaje de muestras positivas por grupo para cada microorganismo, donde es posible apreciar que sólo dos grupos, PPE y PPM presentan casos de coinfección entre *U. urealyticum* y *M. hominis*. Con estos resultados podemos descartar que los micoplasmas genitales sean los agentes causales de los partos prematuros, debido a que se presentan tanto en las placentas de parto a término como en las placentas de parto prematuro, donde

también es importante destacar que al historial clínico no se encontraba diagnosticada ninguna infección, por lo que se desconoce en qué punto del embarazo se dio la infección por estos microorganismos.

8.2. Descripción por grupos con tinción de hematoxilina y eosina

También se buscó establecer si las placentas de parto prematuro presentan una maduración temprana capaz de fomentar el inicio del parto antes de la semana 37 de gestación, para ello se realizó la tinción de hematoxilina y eosina que nos permitiera medir parámetros de maduración de las vellosidades troncales y libres, y que sea posible predecir si las características estructurales influyen en el adelanto de la labor de parto.

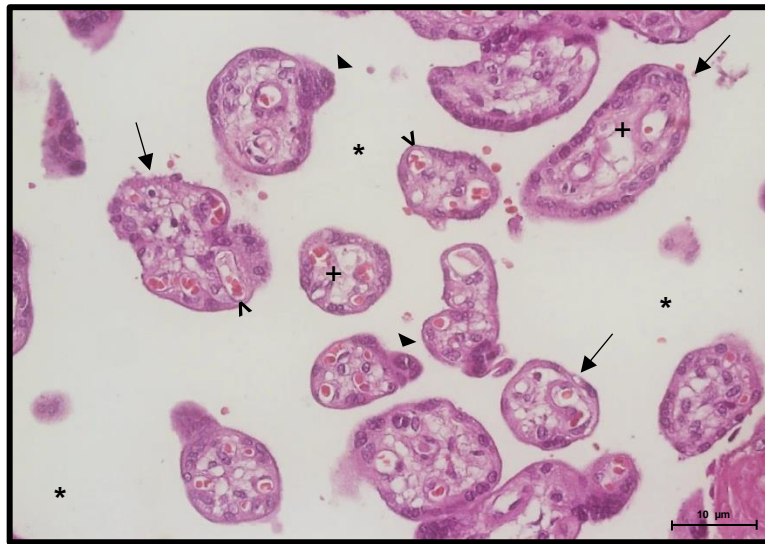


Fig. 9. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con hematoxilina y eosina en un aumento de 400x perteneciente al Grupo C

En la figura 9 se observa una microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con hematoxilina y eosina en un aumento de 400x, esta imagen es representativa de las muestras del Grupo C (parto a término) donde se aprecian pequeñas vellosidades libres (↑) distribuidas entre el espacio intervelloso (*), este se encuentra en menor proporción en comparación con el área que ocupan las vellosidades, la mayoría de estas vellosidades presentan características de vellosidades terminales, un epitelio sincitiotrofoblástico delgado con presencia de nódulos sincitiales (▲) con apariencia de protuberancias en la vellosidad teniendo una coloración basófila más fuerte que el resto del epitelio sincitiotrofoblástico, este envuelve el centro de tejido conectivo denso irregular que contiene fibras colágenas de tinción acidófila (+) y la presencia de vasos (<), específicamente capilares que están orientados hacia la periferia de las vellosidades y entre los que se ven eritrocitos de tinción acidófila en la luz de los capilares.

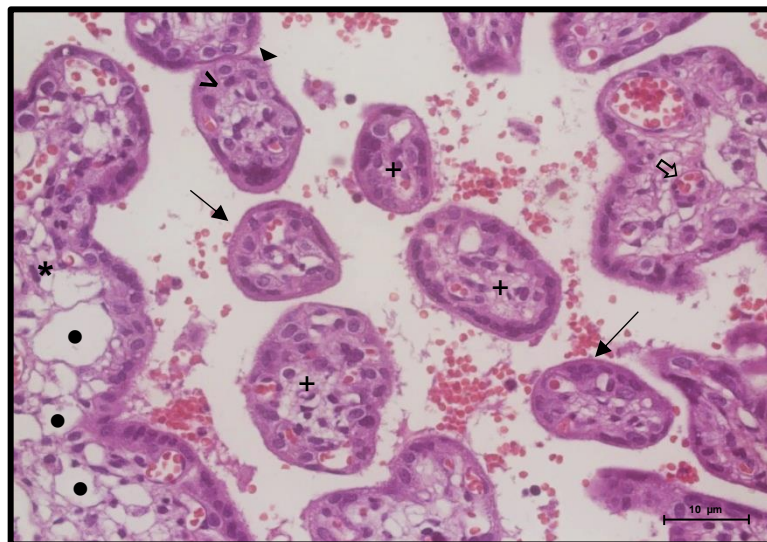


Fig. 10. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con hematoxilina y eosina en un aumento de 400x perteneciente al Grupo PPE

En la figura 10 se obtuvo la microfotografía representativa de un corte histológico de placenta teñido con hematoxilina y eosina representativa del grupo PPE en un aumento de 400x que demuestra menor cantidad de vellosidades libres (↑) y estas son más grandes en comparación con la figura 9, de lado izquierdo se muestra una vellosidad de tipo troncal (*) en la que muestra un epitelio sincitiotrofoblástico (▲), seguido de un epitelio citotrofoblástico (<) y que en su interior se reflejan abundantes huecos llamados canales estromales, que son espacios vacíos de fibras de tejido conectivo, también llamados canales de Kaufmann, no sólo la vellosidad troncal los presenta, sino que se pueden ver en algunas de las vellosidades libres, al igual que la vellosidad troncal, las vellosidades libres muestran en su región más apical un epitelio sincitiotrofoblástico que envuelve al epitelio citotrofoblástico, seguido por un núcleo de tejido conectivo denso irregular (+) con poca presencia de capilares y los cuales, no todos se presentan en la periferia (⇒), así mismo la presencia de canales de Kaufmann (●) que evidencian una baja maduración de las vellosidades cumpliendo las características de una vellosidad inmadura intermedia y madura intermedia en aquellas que ya se ven más desarrollados algunos vasos.

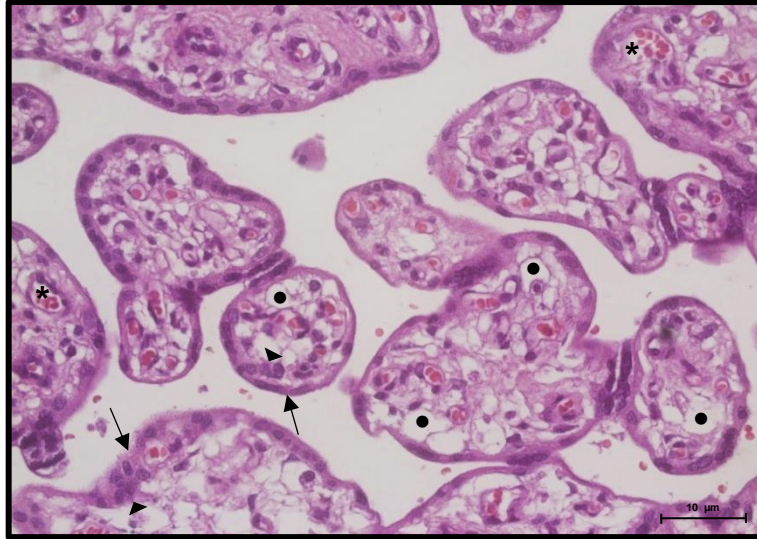


Fig. 11. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con hematoxilina y eosina en un aumento de 400x perteneciente al Grupo PPM

En representación del grupo PPM tenemos en la figura 11 una microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con hematoxilina y eosina en un aumento de 400x, donde podemos observar las vellosidades de un tamaño considerablemente grandes, la mayoría muestra un epitelio sincitiotrofoblástico delgado (↑), con la ausencia de nódulos sincitiales y un epitelio citotrofoblástico (▲), en el interior podemos observar la presencia de capilares (*) bien desarrollados pero también la presencia de canales estromales de Kaufmann (●), en algunas de ellas, por lo que se tendrían tanto vellosidades inmaduras intermedias en poca proporción y en mayor proporción vellosidades maduras intermedias, ya que los capilares no se encuentran distribuidos a la periferia por completo.

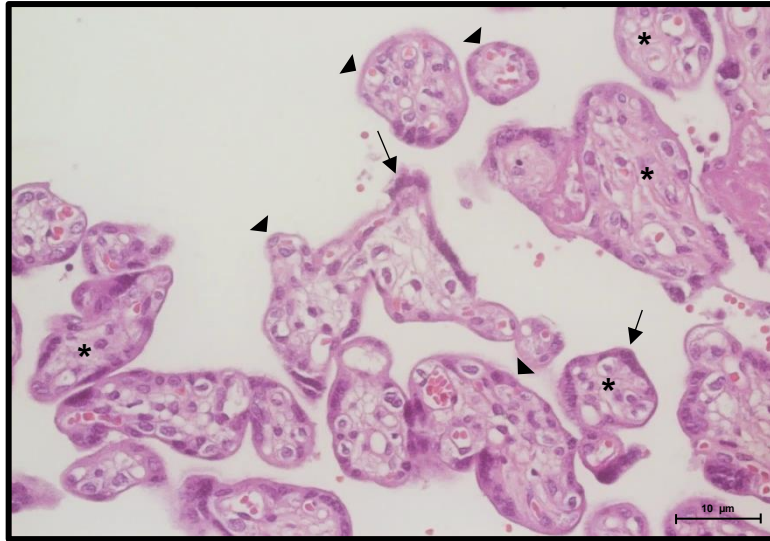


Fig. 12. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con hematoxilina y eosina en un aumento de 400x perteneciente al Grupo PPT

Por último tenemos una microfotografía representativa del grupo PPT de un corte histológico de placenta teñido con hematoxilina y eosina donde podemos observar una mayor cantidad de vellosidades, a diferencia de la figura 10 y 11 que presentan en su mayoría vellosidades intermedias inmaduras y maduras, en la figura 12 podemos observar cómo prevalecen las vellosidades terminales con presencia de nódulos sincitiales (↑), un delgado epitelio sincitiotrofoblástico (▲) que envuelve tejido conectivo denso, viéndose aumentada la hialinización (*) de las vellosidades, parecido al de la figura 9 perteneciente al grupo C, por lo tanto su centro se observa más acidófilo pálido con presencia de capilares orientados hacia la periferia, pudiéndose observar las vellosidades con un menor tamaño y mayor cantidad comparado con la figura 10 y 11 de los grupo PPE y PPM respectivamente.

8.3. Tamaño de Velloidades

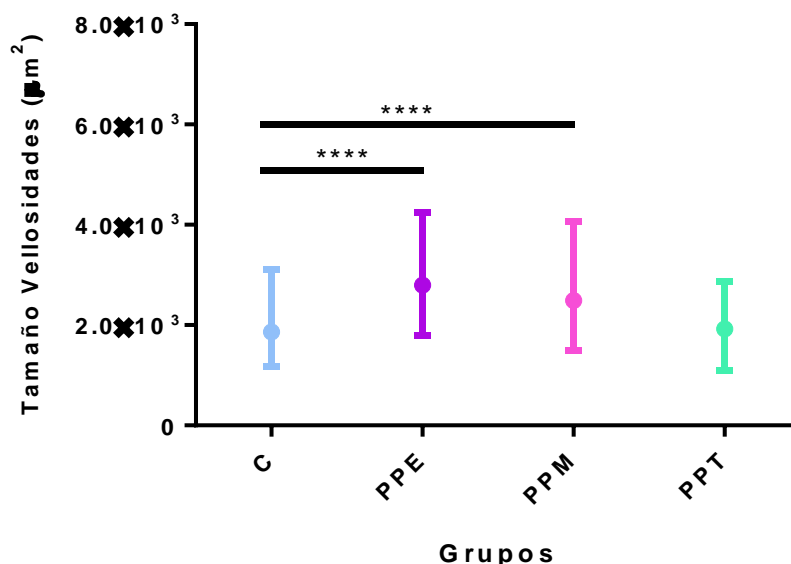


Fig. 13. Grafica de Tamaño de Velloidades, que muestra los valores obtenidos.

(●: mediana, barras: rangos intercuartiles, ****: $p < 0.0001$)

Tras el análisis de los datos, observándose de distribución no normal y siendo tomadas muestras pareadas se procedió a realizar la prueba de U de Mann Whitney para cada uno de los parámetros morfométricos, y un post hoc de Bonferroni, que arrojó los resultados graficados en las figuras siguientes, comenzando con la figura 13, en esta gráfica de columnas se encuentran representadas con un círculo las medianas y con barras los rangos intercuartiles de las mediciones realizadas por grupo, con una $p < 0.0001$ (****) el grupo PPE ($2799\mu\text{m}^2$) y PPM ($2490\mu\text{m}^2$) muestran diferencia significativa con el grupo C ($2490\mu\text{m}^2$), mientras que el grupo PPT ($1924\mu\text{m}^2$) no mostró diferencia significativa con el grupo C. El análisis estadístico también arrojó que hubo diferencia significativa entre los grupos, donde el grupo PPE ($2799\mu\text{m}^2$) muestra

diferencia significativa con $p < 0.01$ (**) respecto al grupo PPM ($2490\mu\text{m}^2$) y $p < 0.0001$ (****) respecto al grupo PPT ($1924\mu\text{m}^2$), al igual que el grupo PPM con $p < 0.0001$ (****) mostró diferencia significativa con el grupo PPT ($1924\mu\text{m}^2$). Esto significa que los grupos PPE y PPM demuestran distinto tamaño de vellosidades respecto al grupo C, que se puede traducir en una diferencia en la maduración, siendo menos maduras las placentas del grupo PPE y PPM, mientras que las placentas del grupo PPT presentan una maduración parecida a las del grupo C y que puede deberse a la cercanía en la cantidad de semanas de gestación entre un grupo y otro.

8.4. Número de Vellosidades

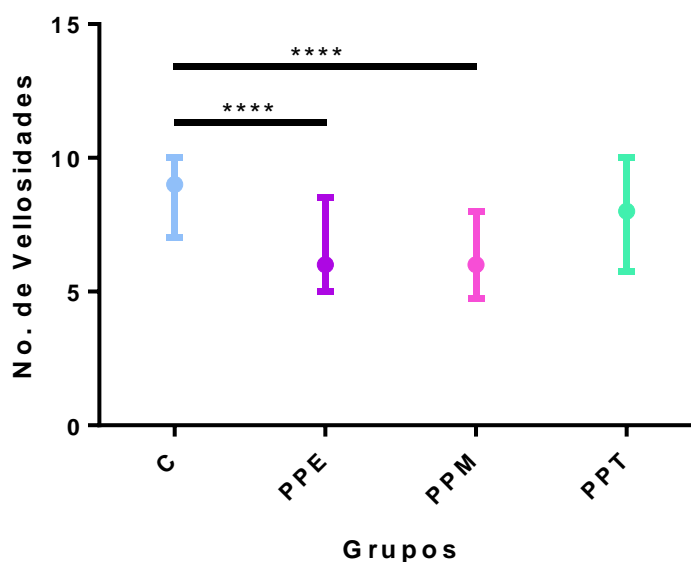


Fig. 14. Grafica de Número de Vellosidades, que muestra los valores obtenidos.

(●: mediana, barras: rangos intercuantiles, ****: $p < 0.0001$)

En el caso del número de vellosidades, la prueba de U de Mann Whitney, como se muestra en la figura 14, reporta que con una $p < 0.0001$ (****) el grupo PPE (6) y PPM(6) muestran diferencia significativa con el grupo C (9), mientras que el grupo PPT (8) no mostró diferencia significativa con el grupo C. El análisis estadístico también demostró que no hubo diferencia significativa entre los grupos PPE(6), PPM(6) y PPT(8). Estos resultados se traducen a que las placentas de los grupos PPE y PPM al presentar vellosidades más grandes en comparación con el grupo C y grupo PPT no presentan la misma maduración que estos últimos dos grupos mencionados, y que posiblemente al no haber diferencia entre el grupo PPT y C se deba a la cercanía en las semanas de gestación, así mismo el que no se presente diferencia del grupo PPT con los grupo PPE y PPM puede deberse a que la maduración entre ambos grupos no se vea reflejada con la medición de este parámetro y que se vea una marcada maduración entre las últimas semanas de gestación a diferencia de semanas de gestación más jóvenes.

8.5. Grosor de la Barrera Placentaria

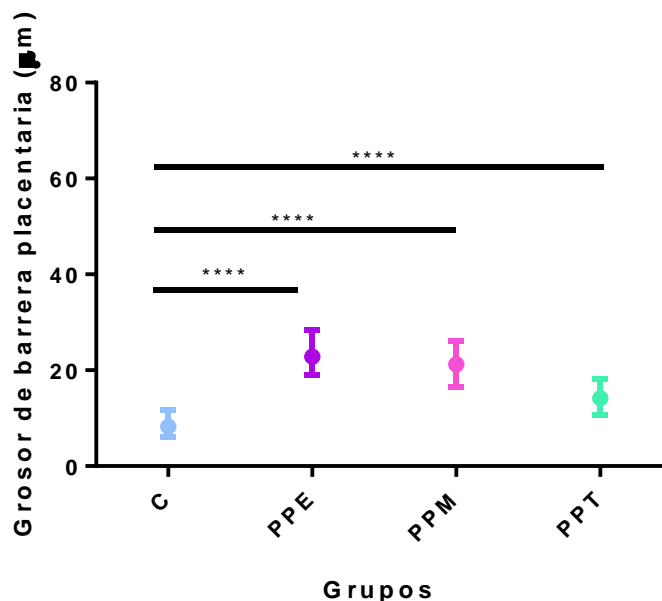


Fig. 15. Grafica de Grosor de la barrera placentaria, que muestra los valores obtenidos. (●: mediana, barras: rangos intercuartiles, **: $p<0.0001$)**

En el caso del grosor de la barrera placentaria, los resultados graficados en la figura 15 muestran con una $p<0.0001$ (****) que el grupo PPE (22.8µm), PPM (21.3µm) Y PPT (14.1µm) muestran diferencia significativa con el grupo C(8.2µm). El análisis estadístico también arrojó que hubo diferencia significativa entre los grupos, donde el grupo PPE (22.8µm) muestra diferencia significativa con $p<0.0001$ (****) respecto al grupo PPM (21.3µm) Y PPT (14.1µm) y el grupo PPM (21.3µm) con $p<0.0001$ (****) respecto al grupo PPT (14.1µm). Es este caso los resultados demuestran una diferencia entre todos los grupos, eso quiere decir que la barrera placentaria no demuestra una maduración, al encontrarse en mayor grosor en los grupos de parto prematuro, sabiendo que un aumento en el

grosor compromete el intercambio de sustancias, que es la función principal de la barrera placentaria.

8.6. Espacio Interveloso

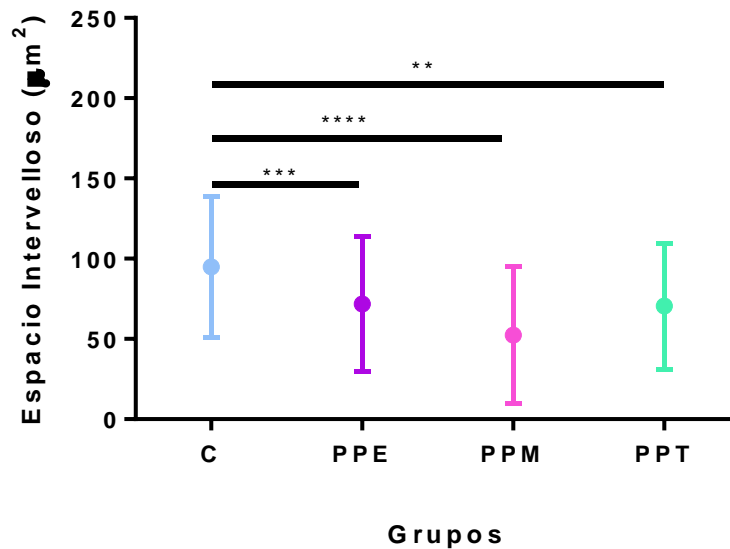


Fig. 16. Grafica de Espacio Interveloso, que muestra los valores obtenidos. (●: mediana, barras: rangos intercuartiles, **: $p<0.01$, *: $p<0.001$, ****: $p<0.0001$)**

Para los datos obtenidos de las mediciones del espacio interveloso, y que se observan graficados en la figura 16, todos los grupos de parto prematuro mostraron diferencia significativa con el grupo de parto a término, con una $p<0.001$ (***) el grupo PPE ($73.2\mu\text{m}^2$) muestra diferencias significativas con el grupo C ($94\mu\text{m}^2$), mientras que con $p<0.0001$ (****) el grupo PPM ($42.6\mu\text{m}^2$) muestra diferencia con el grupo C, así como con una $p<0.01$ (**) el grupo PPT ($71.3\mu\text{m}^2$) muestra diferencia significativa con el grupo C. Entre los grupos también se encontró diferencia significativa, con $p<0.01$ (**) el grupo PPE

(73.2 μm^2) respecto al grupo PPM (42.6 μm^2), y el grupo PPM (42.6 μm^2) respecto al grupo PPT (71.3 μm^2), sólo el grupo PPE (73.2 μm^2) no mostró diferencias respecto al grupo PPT (71.3 μm^2). Estos resultados demuestran que no hay una maduración acelerada de la placenta, ya que el espacio intervilloso se ve incrementado al disminuir las semanas de gestación, evidenciando que hay una menor cantidad de vellosidades y que se puede ver relacionado con lo descrito en la sección 8.4.

8.7. Número de Vellosidades Terminales

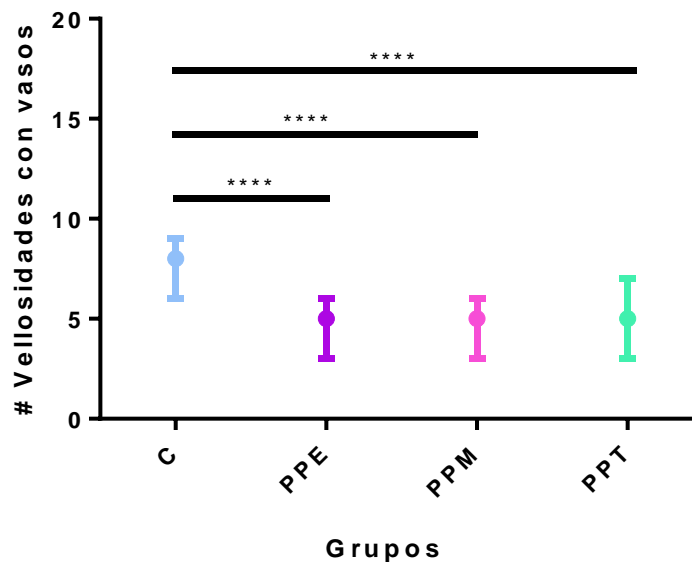


Fig. 17. Grafica Número de Vellosidades, que muestra los valores obtenidos. (●: mediana, barras: rangos intercuartiles, **: $p < 0.0001$)**

Por último en la gráfica de la figura 17 se ve reflejado el número de vellosidades con vasos, específicamente las que presentan capilares totalmente desarrollados aunque no específicamente situados en la periferia, y que se

encuentran principalmente en las vellosidades terminales. Al análisis estadístico todos los grupos de parto prematuro mostraron diferencia significativa respecto al grupo de parto a término, con una $p < 0.0001$ (****) el grupo PPE (5), PPM (5) y PPT (5) mostró diferencia significativa respecto al grupo C (8), mientras que no se encontró diferencia entre los grupos. Estos resultados demuestran que específicamente el desarrollo de los vasos puede llegar a mostrar la misma maduración en todos los grupos de parto pretérmino aunque se diferencien por varias semanas de gestación, sin embargo esta maduración no será equiparable a la maduración de los vasos del grupo de parto a término.

8.8. Depósitos de Fibrina

Posteriormente se realizó la tinción de Hematoxilina Fosfotúngstica (PTAH) en cortes histológicos de placenta con el fin de establecer una medida indirecta tanto del nivel de maduración de las vellosidades, así como de los factores de coagulación presentes en vellosidades libres y troncales.

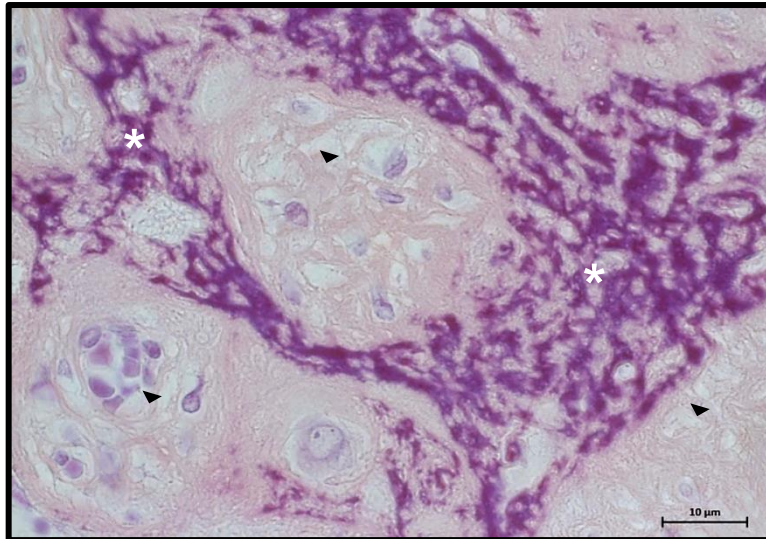


Fig. 18. Microfotografía de un corte de placenta teñido con PTAH en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo C

La figura 18 muestra una microfotografía de un corte histológico de placenta del grupo de parto a término teñido con PTAH observándose en un aumento de 1000x, en este corte podemos apreciar la tinción de los núcleos en color morado pálido, mientras que el depósito de fibrina se destaca en un color magenta-púrpura de tonalidad fuerte (*), este depósito se encuentra rodeado por fibras de colágeno (▲) teñidas de color rosa pálido, que predominan debido a la hialinización en las vellosidades troncales de las placentas a término y los espacios en blanco sin tinción debido a que era donde se encontraba presente

matriz extracelular que se vio perdida durante el proceso de fijación. Es importante destacar que el depósito de estas fibras no está distribuido al azar, sino que se observan bien delimitados la formación de los cúmulos.

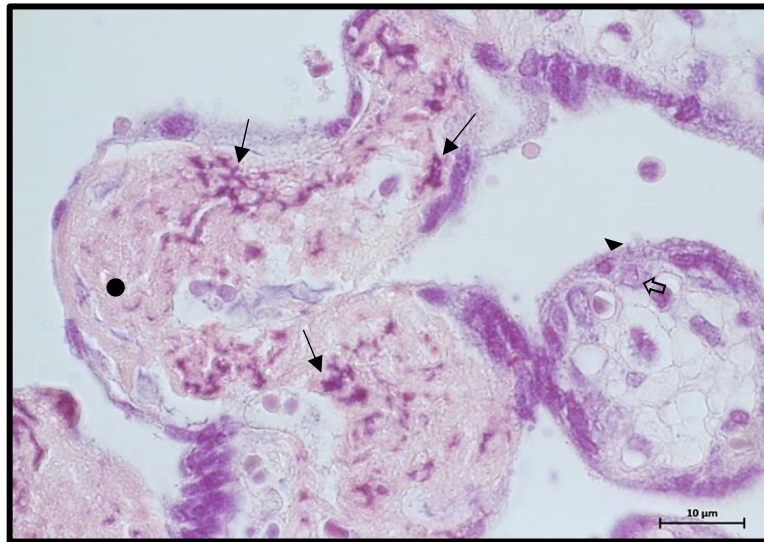


Fig. 19. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con PTAH en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo PPE

En la figura 19 observamos el corte histológico de placenta de parto prematuro extremo teñido con PTAH en un aumento de 1000x, en este caso y en comparación con la figura 18, se puede ver como los depósitos de fibrina (↑) son escasos y estos están distribuidos entre las fibras colágenas sin formar cúmulos bien delimitados, viéndose bien diferenciada la tinción entre los núcleos del epitelio sincitiotrofoblástico (▲) y citotrofoblástico (⇨) y la tinción de los depósitos de fibrina. Es importante destacar que sólo se presenta hialinización (●) en las vellosidades troncales, mientras que las vellosidades libres, no muestran gran cantidad de fibras colágenas en sus núcleos de tejido conectivo.

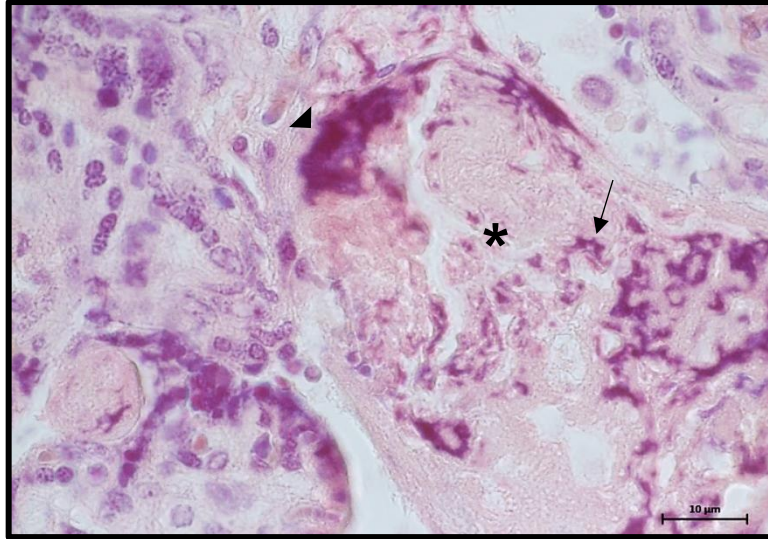


Fig. 20. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con PTAH en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo PPM

Para el caso de la figura 20, en este corte histológico de placenta teñido con PTHA en un aumento de 1000x, se observa principalmente en una vellosidad troncal (*), como la fibrina se ve aislada (↑) entre algunas fibras colágenas (teñidas de rosa pálido) pero en algunas zonas comienza a formar depósitos (▲) (parte superior de la microfotografía) mucho más delimitados, sin embargo no se compraran con los de la figura 18.

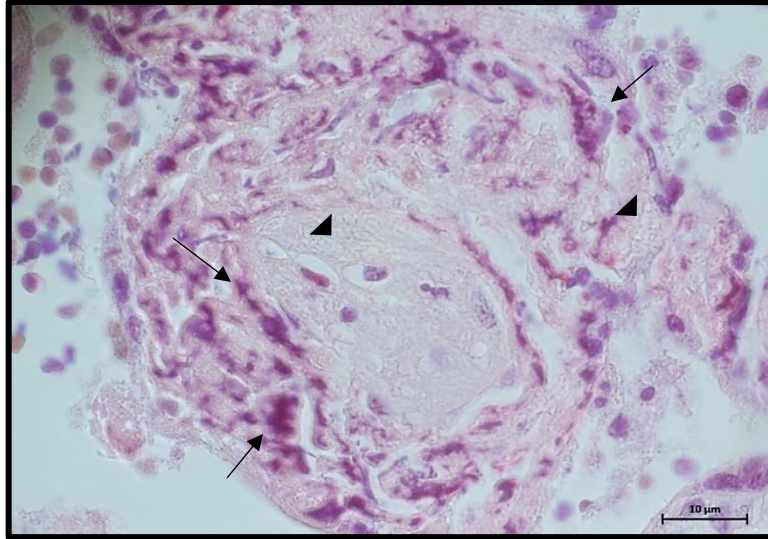


Fig. 21. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con PTAH en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo PPT

Por último tenemos la microfotografía de la figura 21 pertenecientes al corte histológico de placenta teñido con PTAH en un aumento de 1000x del grupo de parto prematuro tardío, donde podemos observar que se ve aumentada la distribución y depósitos de fibrina (↑) a todo alrededor de la vellosidad troncal, aunque muchos de estos depósitos están embebidos entre las fibras colágenas (▲) teñidas de color rosa pálido, se muestran bien contorneados los pequeños depósitos y que se ve aumentada su presencia en contraste con el resto de los grupos de parto prematuro, sin embargo no es comparable con los depósitos encontrados en el caso de las placentas de parto a término.

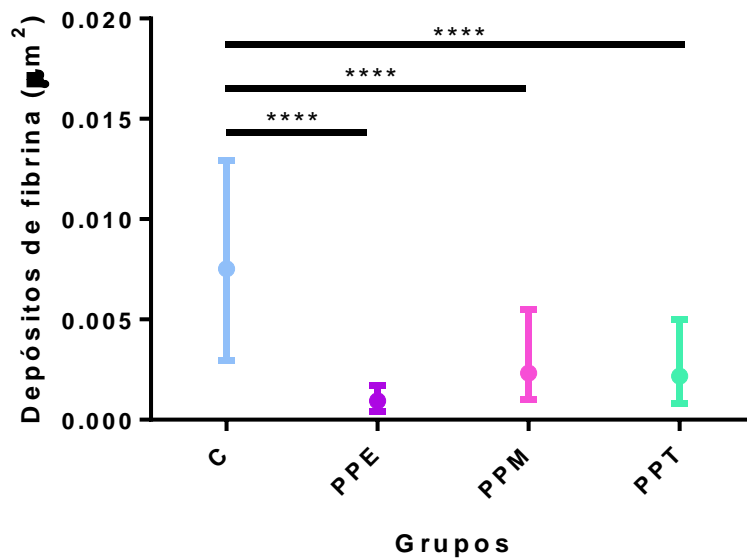


Fig. 22. Grafica de Depósitos de Fibrina, que muestra los valores obtenidos. (● : mediana, barras: rangos intercuartiles, **: $p < 0.0001$)**

Se realizó la medición del área que cubrían los depósitos de fibrina en μm^2 , y se llevó a cabo una prueba de U de Mann Whitney para observar si presentaban diferencia significativa, el análisis estadístico arrojó con una $p < 0.0001$ (****) que todos los grupos de parto pretérmino: PPE ($0.0009\mu\text{m}^2$), PPM ($0.0023\mu\text{m}^2$) y PPT ($0.0022\mu\text{m}^2$) presenta diferencia significativa con el grupo de parto a término: C ($0.0075\mu\text{m}^2$). Así mismo se encontró diferencia significativa entre los grupos de parto pretérmino, con $p < 0.0001$ (****) el grupo PPE ($0.0009\mu\text{m}^2$) respecto al grupo PPM ($0.0023\mu\text{m}^2$), con $p < 0.001$ (***) el grupo PPE ($0.0009\mu\text{m}^2$) respecto al grupo PPT ($0.0022\mu\text{m}^2$), sin encontrarse diferencia entre el grupo PPM ($0.0023\mu\text{m}^2$) y PPT ($0.0022\mu\text{m}^2$).

Con estos resultados se puede concluir que la medición de fibrina como medición indirecta del nivel de maduración refleja que las placentas de parto prematuro no presentan una maduración temprana así mismo tampoco se presenta un aumento de los factores de coagulación que podrían estar causando por el contrario a una hemorragia, un proceso de trombosis en los capilares periféricos.

8.9. Respuesta inflamatoria

Finalmente se buscó analizar si habría un proceso inflamatorio que posiblemente estuviera causando el inicio del parto pretérmino, a través de la tinción de Wright-Giemsa, que permita contabilizar el número de células como neutrófilos y linfocitos, por campo. Sólo se realizó la cuantificación de estos tipos celulares, ya que no hubo presencia de otros tipos celulares como monocitos, macrófagos, eosinófilos o basófilos.

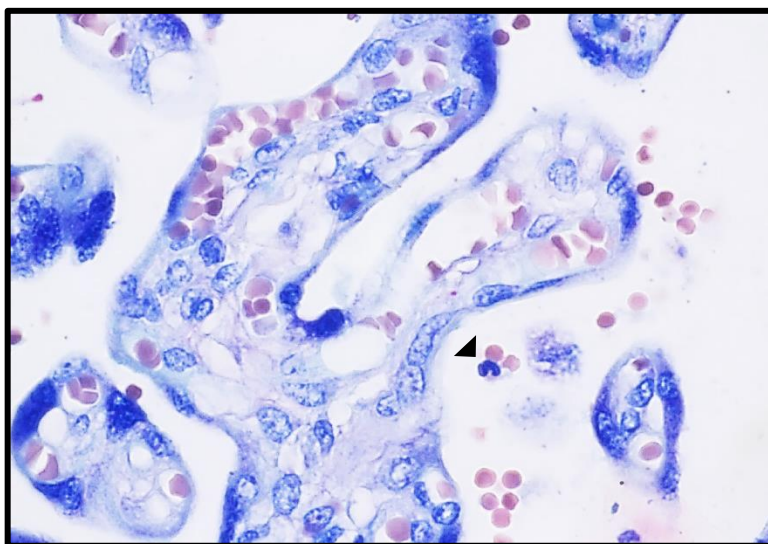


Fig. 23. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con W-G en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo C

En esta microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con Wright-Giemsa en un aumento de 1000x se observa poca cantidad de células de la sangre, principalmente eritrocitos en color rosa pálido y un neutrófilo en banda con un núcleo bilobulado (▲) en color azul y citoplasma de tinción acidófila,

diferenciándose la intensidad del núcleo del neutrófilo de aquellos núcleos del epitelio sincitiotrofoblástico.

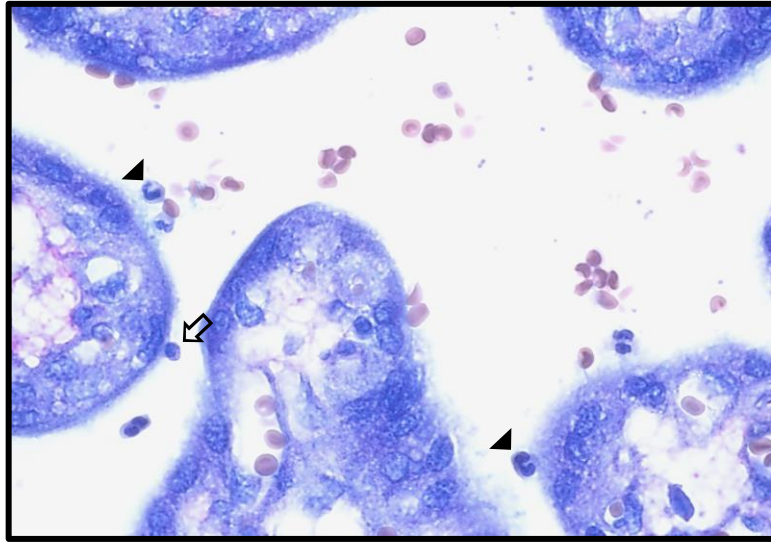


Fig. 24. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con W-G en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo PPE

La figura 24 representa al grupo de parto prematura extremo, en esta microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con W-G en un aumento de 1000x se puede observar una mayor cantidad de células inflamatorias, principalmente neutrófilos (▲), neutrófilos en banda y linfocitos (⇒), pudiendo observar diferencia con la figura 23, donde predominaban mucho más la cantidad de eritrocitos.

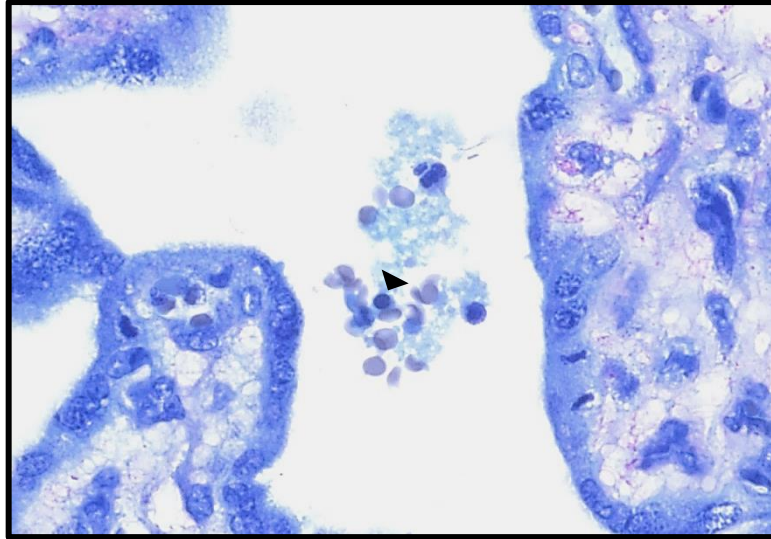


Fig. 25. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con W-G en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo PPM

La microfotografía de la figura 25 pertenece al corte histológico de placenta teñido con Wright-Giemsa del grupo de parto prematuro medio, donde a diferencia de la figura 24, son pocas las células inflamatorias presentes , siendo predominantes los linfocitos (▲).

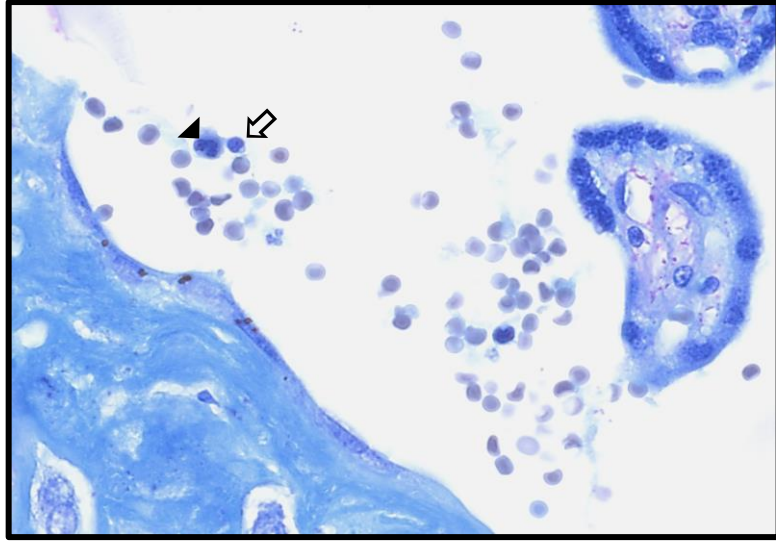


Fig. 26. Microfotografía de un corte histológico de placenta teñido con W-G en un aumento de 1000x perteneciente al Grupo PPT

Por último, en la figura 26 observamos el corte histológico de placenta teñido con W-G en un aumento de 1000x, perteneciente al grupo de parto prematuro tardío, donde al igual de las figuras 23 y 25 se encuentran células inflamatorias en poca cantidad donde se observan tanto neutrófilos (▲) como linfocitos (⇒).

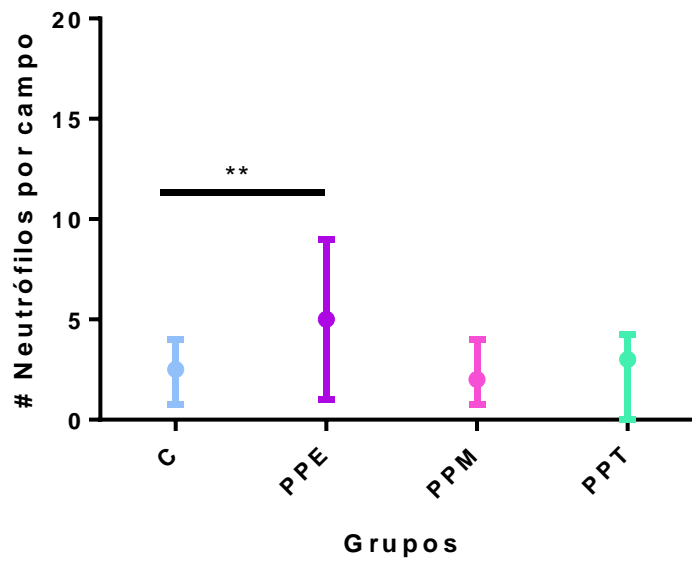


Fig. 27. Grafica del Número de Neutrófilos por campo, que muestra los valores obtenidos. (● : mediana, barras: rangos intercuartiles, **: $p<0.01$).

De las cuantificaciones realizadas y su análisis estadístico a través de una prueba de U de Mann Whitney, se obtuvo la gráfica de la figura 27, donde se graficó el número de neutrófilos por campo, encontrándose diferencia significativa con una $p<0.01$ (**) entre el grupo PPE (5) con los grupos: C (2), PPM (2) y PPT (3). Esto significa que la respuesta inflamatoria sólo se ve elevada en el grupo de parto prematuro extremo en comparación con la respuesta del grupo de parto a término y con el resto de los grupos de parto prematuro, teniendo el grupo PPM y PPT un comportamiento parecido con el grupo C.

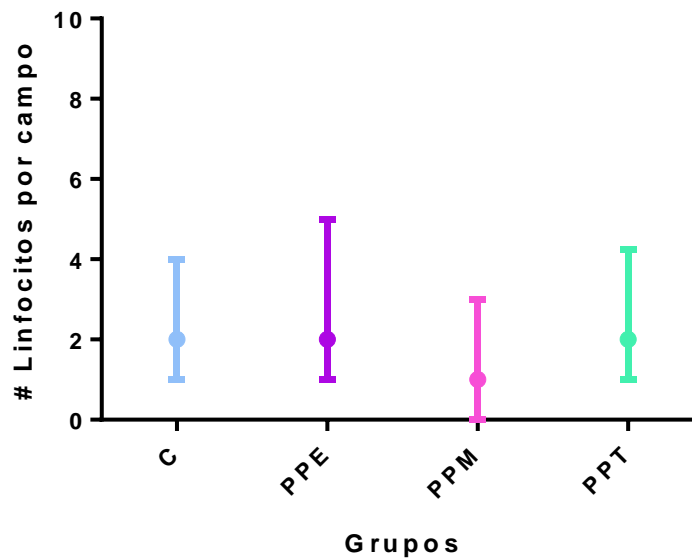


Fig. 28. Grafica del Número de Linfocitos por campo, que muestra los valores obtenidos. (● : mediana, barras: rangos intercuartiles).

Por último se realizó la cuantificación de Linfocitos por campo, con una prueba de U de Mann Whitney, obteniendo los resultados graficados en la figura 28, donde ninguno de los grupos muestra diferencia significativa con el grupo control y entre los grupos de parto pretérmino.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos del objetivo tres, se puede concluir que sólo se ve evidenciado el aumento en el número de neutrófilos en el grupo de parto prematuro extremo con el resto de los grupos, a pesar que aproximadamente el 70% del total de las muestras tenga la presencia de algún agente infeccioso, como se reporta en la sección 8.1, y siendo el segundo grupo más bajo (57.2%) de muestras infectadas, es desconcertante ver un aumento de la actividad inflamatoria en este grupo.

8.10. Resumen de Resultados

En la tabla 8 se muestra un resumen de los valores obtenidos de las mediciones anteriormente descritas, donde se exponen los porcentajes y medianas de los datos analizados estadísticamente.

Tabla 6. Parámetros morfométricos de las vellosidades de placentas

Parámetro/Grupo	C	PPE	PPM	PPT
Presencia de <i>U. urealyticum</i> (%)	0	14.3	14.3	0
Presencia de <i>M. hominis</i> (%)	71.4	42.9	71.4	57.1
Presencia de <i>M. genitalium</i> (%)	0	0	0	0
Tamaño de Vellosidades (μm^2)	1865	2799	2490	1924
Número de vellosidades	9	6	6	8
Grosor de Barrera Placentaria (μm)	8.2	22.8	21.3	14.1
Espacio intervelloso (μm^2)	94	73.2	42.6	71.3
Número de Vellosidades terminales	8	5	5	5
Depósito de Fibrina (μm^2)	0.0075	0.0009	0.0023	0.0022
Neutrófilos por campo	2	5	2	3
Linfocitos por campo	2	2	1	2
Relación Neutrófilos/Linfocitos	1:1	5:2	2:1	3:2

CAPÍTULO 9

DISCUSIÓN

Durante el proceso de la labor de parto, son distintos los mecanismos involucrados que se han descrito que pueden influir en su inicio o activación, centrándose principalmente en que este es un proceso inflamatorio desencadenado por el feto cuando se encuentra completamente desarrollado, sin embargo existen factores que puedan adelantar el proceso poniendo en riesgo la vida del feto o neonato y la madre. Estos factores se relacionan principalmente a un defecto congénito del feto, infecciones bacterianas que aumentan la actividad inflamatoria así como una pobre estimulación hormonal que mantenga el embarazo más de 37 semanas de gestación. Por otra parte se han descrito distintas patologías que describen un daño estructural en los órganos involucrados en la maduración y mantenimiento del feto durante los 9 meses de gestación, sin embargo existen situaciones de parto prematuro donde ninguno de los factores anteriores son reconocidos como agentes causales. La mayoría de los cambios estructurales se reconocen a la examinación macroscópica de los órganos, sin embargo no se ha dado importancia a un estudio profundo de examinación microscópica que permita predecir la aparición de esta situación. Por eso el objetivo de este trabajo fue caracterizar el nivel de maduración de las vellosidades placentarias de parto prematuro debido a un proceso inflamatorio que desencadene tal maduración.

Comenzando con la detección de un agente causal de infección y principal microorganismo asociado a abortos espontáneos (Sander et al., 1988), se demostró la presencia de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* tanto en casos (grupos de parto prematuro extremo, medio y tardío) como en los controles (parto a término) por lo que podríamos descartar que este sea el agente causal del parto prematuro, si bien se ha reportado que este se presenta sólo en el 52% de los embarazos complicados en general (Stein et al., 1994) nosotros reportamos que mínimo en el caso del PPT llegamos a tener 52% de placentas infectadas, mientras que en los grupos de PPE y PPM llega a ser hasta un 85.7% de muestras infectadas por cualquiera de estos micoplasmas.

Es importante destacar que la presencia de micoplasmas genitales como agentes causales de pérdida fetal se encuentran reportados principalmente en embarazos de segundo trimestre (Larsen et al., n.d.) o sea, aquellos pertenecientes a la categoría de PPE sin embargo nosotros encontramos que la mayoría las muestras positivas pertenecen a parto que llegaron a mitad o final de tercer trimestre, o sea a aquellos de los grupo PPT y grupo C.

Se ha reportado que a pesar de encontrar la presencia de estos micoplasmas de manera específica en abortos espontáneos, esto no significa que sea sólo este agente el que propicie el parto prematuro, sino que cualquier otro microorganismo perteneciente a una vaginosis bacteriana adyacente a la infección por micoplasma o sino alguna otra bacteria de la microbiota placentaria permita una acción distinta del micoplasma que lleve a la aparición de parto

premature (Iliopoulou et al., 2017) or that it is the opposite, neutralizing its action by provoking that it does not have a lethal effect on the onset of labor, but nevertheless it is difficult to establish it because until now it is unknown if the microbiota of premature placenta, without antecedent of infection, shows a difference with the microbiota of healthy placentas (Aagaard et al., 2014).

Posteriormente se realizó la morfometría para observar si las placentas de parto prematuro mostraban signos de maduración temprana de las vellosidades libres que justificara el inicio de la labor de parto. Los primeros dos parámetros a evaluar fueron el número y tamaño de las vellosidades, donde todos los grupos mostraron diferencia significativa con el grupo control o de parto a término, teniendo esto en cuenta, no hay una maduración temprana de las vellosidades, al contrario, se podría presumir que las vellosidades pueden mostrar un retraso en la maduración normal después de la semana 28 de gestación y que coincide ya reportado en la literatura (Kondakova et al., 2020), donde demuestra una involución de la vellosidades que podría llevar a cambios distróficos de las vellosidades coriónicas, y que pudiera tener un doble efecto, ya sea un mecanismo compensatorio que permita el embarazo a término o un mecanismo de ataque que busque la supervivencia del feto fuera de la cavidad uterina.

Las siguientes mediciones que se llevaron a cabo fue la medición del espacio intervilloso, el número de vellosidades con vasos bien desarrollados y el grosor de la barrera placentaria, en los cuáles también se encontró diferencia significativa de los grupos de parto pretérmino con el grupo control (parto a

término) demostrando al igual que las mediciones anteriores, que las vellosidades no muestran una maduración temprana, sin embargo, en el caso del número de las vellosidades con vasos bien desarrollados se encontró diferencia significativa con el grupo control, ya se encuentra establecido que para la semana 25 de gestación debe darse por terminada la vasculogénesis y angiogénesis en las vellosidades libres (Wang, 2017) no obstante pareciera que hay un retraso en la maduración de los capilares, en la literatura se menciona que la normalidad sería encontrar una maduración acelerada cuando el parto prematuro presenta diagnósticos como preeclampsia y corioamnionitis debido a que se debe compensar la insuficiencia placentaria, en este caso no se tiene diagnóstico de ninguna patología sin embargo esa insuficiencia no se está viendo reflejada al observar una pobre maduración vellosa (Vangrieken et al., 2020), por lo que posiblemente el único mecanismo de sobrevivencia sea la expulsión del producto. Así mismo, se reporta que al tener una mala adaptación o desarrollo vascular de la placenta puede desencadenar en un proceso de malperfusión placentaria (Atlass et al., 2020), sin embargo los vasos analizados, que fueron los de las vellosidades libres y troncales, no presentaban signos de remodelación, al contrario se presentaban bien desarrollado, sin embargo había muy poca cantidad en comparación con las placentas a término.

En el caso del grosor de la barrera placentaria es importante destacar que una disminución en el grosor es lo que caracteriza en aquellas vellosidades terminales, ya que de esta manera el intercambio de sustancias es el óptimo (Benirschke et al., 2006) debido al aumento de demanda de nutrientes a partir

del segundo trimestre de gestación (Sadler, 2012), sin embargo los resultados demuestran que todos los grupos de parto prematuro su grosor está muy por encima de lo encontrado en los controles, eso quiere decir que el intercambio de sustancias no es el óptimo, y como ya se ha reportado, la duración del embarazo depende de la condición de la placenta, si en este caso esa insuficiencia en el adecuado transporte de sustancias no se ve compensado o tenga reacciones de adaptación se va a ver incrementado el riesgo de parto pretérmino (Kurochka et al., 2019).

Y no sólo aumenta el riesgo de una labor de parto adelantada, sino también se ha reportado que al haber una insuficiencia de oxígeno en la placenta, esta aumenta los niveles de la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF1A), que desencadena la disminución en la actividad del transporte de aminoácidos, por lo que se ve aumentada una restricción de crecimiento fetal (Jaiman et al., 2020; Sayama et al., 2020).

También se ha evidenciado, a través de modelos animales, que bajos niveles de oxígeno llevan a la hipoxia fetal debido al aumento de especies reactivas de oxígeno, que provocan un aumento en el estrés oxidativo de la placenta, llevando a una reducción del peso fetal así como a un aumento en el peso de la placenta (Silvestro et al., 2020) por lo que esto podría ser un indicativo del porqué la placenta puede presentarse con una morfología macroscópica normal, sin embargo eso no significa que tenga un desarrollo estructural microscópico adecuado, así mismo tiempo se ha demostrado que eleva los

niveles de calcio que sólo han sido relacionados a problemas fetales como enfermedades cardiovasculares y neurológicos (Cai et al., 2012; Gallin & Greenberg, 1995; Wang, 2017) pero debemos recordar que parte del mecanismo de inducción del parto es el aumento de la actividad contráctil, la cual también puede verse influenciada por este aumento de calcio, sin embargo no hay evidencia, aun , de que este pueda ser un posible mecanismo de inducción del parto prematuro.

En lo que respecta a los depósitos de fibrina es evidente tanto en las microfotografías como en el análisis estadístico la diferencia significativa de los grupos de parto pretérmino con el grupo control. Desde hace tiempo se ha reportado que un aumento de estos depósitos puede ser signo de una maduración temprana de la placenta (Benirschke et al., 2006), así como que es capaz de inducir hipertensión y preeclampsia cuando se ve aumentada en vellosidades terminales (Kanfer et al., 1996) mostrándose en mayor cantidad de depósitos que en una placenta sana a término, así mismo esta deposición de fibrina perivellosa es asociada a abortos espontáneos recurrentes, disminución de crecimiento fetal y muerte fetal (Whitten et al., 2013) así como el síndrome de insuficiencia placentaria (Bane & Gillan, 2003) sin embargo si lo comparamos con las mediciones obtenidas, podemos observar que la insuficiencia placentaria no se verá influenciada sólo por un incremento de estos niveles, sino que cuando estos estén por debajo debido a desarrollo retrasado de las vellosidades, también puede desencadenar en insuficiencia placentaria, que si bien no hay un incremento de factores de coagulación por una hipertensión descontrolada, sino

que hay un decremento de estos debido a que la anatomía vascular vellosa se encuentra comprometida.

Por último en relación a la presencia de respuesta inflamatoria en las placentas de parto prematuro, se observó como el grupo de PPE mostró diferencia significativa con el grupo control así como con el resto de los grupos de parto prematuro, en el caso del conteo de neutrófilos, viéndose aumentado mientras que en el conteo de linfocitos ningún grupo muestra diferencia significativa con el control ni entre los grupos. Debemos recordar que según el análisis molecular, la mayoría de casos como controles contaba con la presencia de agentes infecciosos como lo son los micoplasmas genitales, en específico *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, sin embargo el grupo PPE es el único en demostrar un aumento, si bien el que todos los grupos presenten una misma respuesta inflamatoria comparable con la del grupo control nos puede llevar a suponer que en estadíos tempranos una respuesta inflamatoria igual a la del embarazo a término implica que esta está elevada en las placentas de parto prematuro, sin embargo eso no significa que el aumento de la respuesta inflamatoria sólo se deba a la presencia de una infección bacteriana, reportes previos mencionan que puede deberse a problemas cardíacos fetales también, donde demuestran que cambios en la función cardíaca fetal aunado a la invasión de agentes infecciosos es capaz de alterar el rompimiento de las membranas provocando hasta un tercio de los partos prematuros, siendo un problema estructural en el feto, el que lo lleve a una deficiencia en el intercambio gaseoso provocando el parto prematuro. (R Romero et al., 2004)

También es importante destacar que ya se ha reportado que el índice de neutrófilos/ linfocitos es una manera de medir el componente inflamatorio que permita la predicción de trastornos vasculares, como la hipoperfusión placentaria (Ghelfi et al., 2018), si bien no hay diferencia entre los índices obtenidos comparando el grupo control con los grupos de parto pretérmino esto puede significar que los partos prematuros se hayan dado por que disminuye el flujo sanguíneo hacia la placenta, privando al feto del intercambio de oxígeno y nutrientes, al mismo tiempo que las actividades endócrinas de la placenta, como lo es la producción de progesterona para el mantenimiento del embarazo, se vea disminuida, llevando al inicio de la actividad contráctil por parte del miometrio, así mismo se reporta que si esta relación se ve aumentada en comparación con el control, como lo reportado con nuestras mediciones, sea seguro que presenten el síndrome de preeclampsia. (Reyna-Villasmil et al., 2018)

CAPÍTULO 10

CONCLUSIONES

Las conclusiones este trabajo, serían las siguientes:

Los micoplasmas no son los agentes causales de los partos prematuros, encontrándose presentes en casos y controles, pero que posiblemente puedan estar influyendo como parte de un conjunto de variables que lleven a un rompimiento de membranas temprano.

Las vellosidades no muestran una maduración temprana antes de la semana 37 de gestación así como poco desarrollo de vasos sanguíneos a la periferia, al contrario, se presentan inmaduras en comparación con las características habituales que deberían presentar a la semana 22 de gestación, comprometiendo principalmente la formación de la barrera placentaria afectando directamente el intercambio de oxígeno y nutrientes, llevando al feto a un estado de hipoxia que ya se ha demostrado influencia la aparición de un parto prematuro, así como secuelas en el feto.

La respuesta inmune presente en los casos no muestra diferencia significativa comparada con los controles, por lo que al mostrar una respuesta inflamatoria al igual que los controles se pudiera concluir que se encuentra alterada al estadio en el que están las placentas de partos prematuros, provocado no sólo por la presencia de agentes infecciosos, sino un problema estructural en el desarrollo vascular fetal y placentario.

CAPÍTULO 11

PERSPECTIVAS

Con base en lo discutido en el capítulo 9 las perspectivas de este trabajo, sería realizar análisis moleculares que nos permitan asegurar la disminución de factores involucrados en la maduración y que reflejen el pobre desarrollo estructural vascular, así mismo identificar la presencia de polimorfismos que lleve a una misma madre a desarrollar un parto prematuro en repetidas ocasiones sin presentar alguna patología de las ya conocidas.

CAPÍTULO 12

REFERENCIAS

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237), 1–11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Ananth, C. v., & Vintzileos, A. M. (2006). Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 19(12), 773–782. <https://doi.org/10.1080/14767050600965882>
- Atlass, J., Menke, M., Parks, W. T., & Catov, J. M. (2020). Pre-conception blood pressure and evidence of placental malperfusion. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 20(25), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12884-019-2699-3>
- Avagliano, L., Locatelli, A., Danti, L., Felis, S., Mecacci, F., & Bulfamante, G. (2015). Placental histology in clinically unexpected severe fetal acidemia at term. *Early Human Development*, 91(5), 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.03.004>
- Bane, A. L., & Gillan, J. E. (2003). Massive perivillous fibrinoid causing recurrent placental failure. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 110(3), 292–295. [https://doi.org/10.1016/s1470-0328\(03\)00919-4](https://doi.org/10.1016/s1470-0328(03)00919-4)
- Benirschke, K., Kaufmann, P., & Baergen, R. N. (2006). *Pathology of the Human Placenta* (5th ed.). Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Cai, Y., Yi, J., Zhou, C., & Shen, X. (2012). Pharmacogenetic study of drug-metabolising enzyme polymorphisms on the risk of anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *PloS One*, 7(10), e47769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047769>
- Cao, B., Stout, J., Lee, I., & Mysorekar, U. (2014). Placental microbiome and its role in preterm birth. *NeoReviews*, 15(12), e537–e545. <https://doi.org/10.1542/neo.15-12-e537>
- Chisholm, K. M., Norton, M. E., Penn, A. A., & Heerema-McKenney, A. (2018). Classification of Preterm Birth With Placental Correlates. *Pediatric and Developmental Pathology*, 21(6), 548–560. <https://doi.org/10.1177/1093526618775958>
- Eloundou, S. N., Lee, J. Y., Wu, D., Lei, J., Feller, M. C., Ozen, M., Zhu, Y., Hwang, M., Jia, B., Xie, H., Clemens, J. L., McLane, M. W., AlSaggaf, S., Nair, N., Wills-Karp, M., Wang, X., Graham, E. M., Baschat, A., & Burd, I. (2019). Placental malperfusion in response to intrauterine inflammation and its connection to fetal sequelae. *PLoS ONE*, 14(4), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214951>
- Embree, J. E., Krause, V. W., Embil, J. A., & MacDonald, S. (1980). Placental Infection with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*: Clinical Correlation. *Obstetrics and Gynecology*, 46(4), 475–481.
- Farina, L., & Winkelman, C. (2005). A review of the role of proinflammatory cytokines in labor and noninfectious preterm labor. *Biological Research for Nursing*, 6(3), 230–238. <https://doi.org/10.1177/1099800404271900>

- Gallin, W. J., & Greenberg, M. E. (1995). Calcium regulation of gene expression in neurons: the mode of entry matters. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(3), 367–374. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80050-6](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80050-6)
- Ghelfi, A. M., Lassus, M. N., Diodati, S., & Hails, E. A. (2018). Utilidad del índice neutrófilo/linfocito y del índice polimorfonuclear/monomorfonuclear, en la predicción de preeclampsia. *Hipertension y Riesgo Vascular*, 36(2), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.hipert.2018.06.001>
- Iliopoulou, S., Pagonopoulou, O., Tsigalou, C., Deftereou, T., Koutlaki, N., Tsikouras, P., Papadatou, V., Tologkos, S., Alexiadis, T., Alexopoulou, S., & Lambropoulou, M. (2017). Mycoplasma hominis Infection in Spontaneous Abortions in Thrace Population: Detection by PCR. *Human Genetics & Embryology*, 7(3), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2161-0436.1000142>
- Jaiman, S., Romero, R., Pacora, P., Jung, E. J., Kacerovsky, M., Bhatti, G., Yeo, L., & Hsu, C. D. (2020). Placental delayed villous maturation is associated with evidence of chronic fetal hypoxia. *Journal of Perinatal Medicine*, 48(5). <https://doi.org/10.1515/jpm-2020-0014>
- Kanfer, A., Bruch, J. F., Nguyen, G., He, C. J., Delarue, F., Flahault, A., Nessmann, C., & Uzan, S. (1996). Increased placental antifibrinolytic potential and fibrin deposits in pregnancy-induced hypertension and preeclampsia. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 74(1), 253–258.
- Kaufmann, P., & Scheffen, I. (1992). *Placental development. In, Neonatal and Fetal Medicine—Physiology and Pathophysiology, Vol. 1. R. Polin and W. Fox, eds., pp. 47-55.*

- Kondakova, L. I., Shatilova, Yu. A., Fedorenko², S. V., Yarygin², O. A., Zagrebin¹, V. L., & Zharkin, N. A. (2020). Morphofunctional Structural Features of Placenta in Women With Late Preterm Birth. *Выпуск*, 1(73), 25–27. [https://doi.org/10.19163/1994-9480-2020-1\(73\)-25-27](https://doi.org/10.19163/1994-9480-2020-1(73)-25-27)
- Kramann, R., Dirocco, D. P., & Humphreys, B. D. (2013). Understanding the origin, activation and regulation of matrix-producing myofibroblasts for treatment of fibrotic disease. *Journal of Pathology*, 231(3), 273–289. <https://doi.org/10.1002/path.4253>
- Kurochka, K. M. P., Volokitina, V. E. I., Babaeva, B. M. L., VOldokhina E, Vo. E. M., & Markina, M. V. V. (2019). Comparative characteristics of preterm births. *Akusherstvo i Ginekologiya*, 12(12), 74–81. <https://doi.org/10.18565/aig.2019.12.76-82>
- Larsen, B., Deseta, F., Hwang, J., Meriardi, M., & Tirán-Saucedo, J. (n.d.). *Infectious Diseases and Prematurity*.
- Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., Rudan, I., Campbell, H., Cibulskis, R., Li, M., Mathers, C., & Black, R. E. (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet*, 379(9832), 2151–2161. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60560-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60560-1)
- Mendelson, C. R. (2009). Minireview: Fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. In *Molecular Endocrinology* (Vol. 23, Issue 7). <https://doi.org/10.1210/me.2009-0016>
- Mestan, K., Yu, Y., Matoba, N., Cerda, S., Demmin, B., Pearson, C., Ortiz, K., & Wane, X. (2010). Placental inflammatory response is associated with poor

- neonatal growth: Preterm birth cohort study. *Pediatrics*, 125(4), e891–e898.
<https://doi.org/10.1542/peds.2009-0313>
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2013). *Embriología Clínica* (9th ed.). Elsevier España.
- Morgan, T. K. (2016). Role of the Placenta in Preterm Birth: A Review. *American Journal of Perinatology*, 33(3), 258–266. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1570379>
- Nelson, D. M., Crouch, E. C., Curran, E. M., & Farmer, D. R. (1990). Trophoblast interaction with fibrin matrix: Epithelialization of perivillous fibrin deposits as a mechanism for villous repair in the human placenta. *American Journal of Pathology*, 136(4), 855–865. [/pmc/articles/PMC1877640/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1877640/)
- Nijman, T. A. J., van Vliet, E. O. G., Benders, M. J. N., Mol, B. W. J., Franx, A., Nikkels, P. G. J., & Oudijk, M. A. (2016). Placental histology in spontaneous and indicated preterm birth: A case control study. *Placenta*, 48, 56–62.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.10.006>
- Odibo, A. O., Zhong, Y., Longtine, M., Tuuli, M., Odibo, L., Cahill, A. G., Macoes, G. A., & Nelson, D. M. (2011). First-trimester serum analytes, biophysical tests and the association with pathological morphometry in the placenta of pregnancies with preeclampsia and fetal growth restriction. *Placenta*, 32(4), 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.01.016>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Embarazo y Parto Prematuro*.
<https://www.who.int/topics/pregnancy/es/>
- Pararas, M. v., Skevaki, C. L., & Kafetzis, D. A. (2006). Preterm birth due to maternal infection: Causative pathogens and modes of prevention. In

- European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (Vol. 25, Issue 9, pp. 562–569). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0190-3>
- Pelzer, E., Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., & Nitert, M. D. (2016). Review: Maternal health and the placental microbiome. *Placenta*, 54, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.003>
- Raghunath, G., Vijayalakshmi, & Shenoy, V. (2011). A study on the Morphology and the Morphometry of the human placenta and its clinical relevance in a population in Tamilnadu. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 5(2), 282–286.
- Reyna-Villasmil, E., Mejia-Montilla, J., Reyna-Villasmil, N., Torres-Cepeda, D., & Fernández-Ramírez, A. (2018). Utilidad diagnóstica de la relación neutrófilos/linfocitos en embarazadas con preeclampsia. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 83(3), 257–265. <https://doi.org/10.4067/s0717-75262018000300257>
- Romero, R., Espinoza, J., Gomez, R., Medina, L., Silva, M., Chaiworapongsa, T., Yoon, B., Ghezzi, F., Lee, W., Treadwell, M., Berry, S., Maymon, E., Mazor, M., & DeVore, G. (2004). Fetal cardiac dysfunction in preterm premature rupture of membranes. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 16(3), 146–157. <https://doi.org/10.1080/14767050400009279>
- Romero, Roberto, Sirtori, M., Oyarzun, E., Avila, C., Mazor, M., Callahan, R., Sabo, V., Athanassiadis, A. P., & Hobbins, J. C. (1989). Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *American*

- Journal of Obstetrics and Gynecology*, 161(3), 817–824.
[https://doi.org/10.1016/0002-9378\(89\)90409-2](https://doi.org/10.1016/0002-9378(89)90409-2)
- Sadler, T. W. (2012). *Embriología Médica de Langman* (12th ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer.
- Sander, C. H., Harrison, A. K., & Ayala, C. (1988). Mycoplasma-like Particles within the Placenta: A Potential Placental-Fetal Pathogen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 549(1), 81–102. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb23962.x>
- Sayama, S., Song, A., Brown, B. C., Couturier, J., Cai, X., Xu, P., Chen, C., Zheng, Y., Iriyama, T., Sibai, B., Longo, M., Kellems, R. E., D'Alessandro, A., & Xia, Y. (2020). Maternal erythrocyte ENT1-mediated AMPK activation counteracts placental hypoxia and supports fetal growth. *JCI Insight*, 5(10). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.130205>
- Silvestro, S., Calcaterra, V., Pelizzo, G., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2020). Prenatal Hypoxia and Placental Oxidative Stress: Insights from Animal Models to Clinical Evidences. *Antioxidants*, 9(5), 414. <https://doi.org/10.3390/antiox9050414>
- Stein, A., Boubli, L., Blanc, B., & Raoult, D. (1994). Genital Mycoplasmas in Placental Infections. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 1(6), 275–281. <https://doi.org/10.1155/S1064744994000244>
- Torpin, R. (1969). Placentation in the Rhesus Monkey *Macaca mulatta*. *Obstetrics and Gynecology*, 410–413.

- van den Broek, N. R., Jean-Baptiste, R., & Neilson, J. P. (2014). Factors Associated with Preterm, Early Preterm and Late Preterm Birth in Malawi. *PLoS ONE*, 9(3), e90128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090128>
- Vangrieken, P., Vanterpool, S. F., van Schooten, F. J., Al-Nasiry, S., Andriessen, P., Degreef, E., Alfer, J., Kramer, B. W., & von Rango, U. (2020). Histological villous maturation in placentas of complicated pregnancies. *Histology and Histopathology*, 18205. <https://doi.org/10.14670/HH-18-205>
- Wang, Y. (2017). *Vascular biology of the placenta* (N. Granger & J. P. Granger, Eds.; 2nd ed.). Morgan & Claypool Publishers Life Sciences. <https://doi.org/10.4199/c00016ed1v01y201008isp009>
- Whitten, A. E., Romero, R., Korzeniewski, S. J., Tarca, A. L., Schwartz, A. G., Yeo, L., Dong, Z., Hassan, S. S., & Chaiworapongsa, T. (2013). Evidence of an imbalance of angiogenic/antiangiogenic factors in massive perivillous fibrin deposition (maternal floor infarction): A placental lesion associated with recurrent miscarriage and fetal death. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 208(4), 310.e1-310.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.01.017>

CAPÍTULO 13

APÉNDICE A

PROCESAMIENTO AUTOMÁTICO DE LAS MUESTRAS HISTOKINETTE

Formol al 10% (si el material está sin fijar) mínimo	2 hrs.
Alcohol etílico de 60%	60 minutos
Alcohol etílico de 70%	60 minutos
Alcohol etílico de 80%	60 minutos
Alcohol etílico de 96%	60 minutos
Alcohol etílico de 96%	60 minutos
Alcohol etílico Absoluto	60 minutos
Alcohol etílico Absoluto	60 minutos
Etanol Absoluto y Xilol (1:1)	60 minutos
Xilol	60 minutos
Xilol	60 minutos
Parafina líquida (1° baño)	60 minutos
Parafina líquida (2° baño)	60 minutos
Colocar parafina y hacer el bloque	
Colocar parafina líquida en un molde metálico, fuera de la estufa, e inducir la muestra en él con la orientación deseada.	

APÉNDICE B

Tinción de Hematoxilina y Eosina

1. Desparafinación de las laminillas.

- a. Lavar las laminillas en dos cambios de xilol durante 3 minutos cada uno.
- b. Lavar las laminillas en dos cambios de etanol absoluto durante 3 minutos cada uno.
- c. Lavar las laminillas en dos cambios de etanol al 95% durante 3 minutos cada uno.
- d. Lavar las laminillas una vez en etanol al 70% durante 3 minutos.
- e. Lavar las laminillas en dos cambios de agua bidestilada durante 1 minuto cada uno.

2. Tinción con la solución de hematoxilina.

- a. Colocar las laminillas en la solución de hematoxilina de Harris, filtrada recientemente durante 6 a 15 minutos.
- b. Lavar en dos cambios de agua bidestilada durante 1 minuto cada uno.

3. Diferenciación.

- a. Sumergir de una a dos veces las laminillas en la solución de alcohol ácido al 1%.
- b. Lavar en agua corriente durante 2 minutos.

4. Viraje del color.

- a. Colocar las laminillas en una solución débil de agua amoniacal hasta que las secciones se vean de un color azul brillante.
- b. Lavar en agua corriente durante 5 minutos.
- c. Lavar en dos cambios de agua bidestilada durante 1 minuto cada uno.

5. Tinción con la solución de eosina.

- a. Colocar las laminillas en la solución de eosina-floxina durante 3 a 5 minutos.
- b. Lavar en dos cambios de agua bidestilada durante 1 minuto cada uno.

6. Deshidratación de la muestra

- a. Lavar las laminillas una vez en etanol al 70% durante 1 minuto.
- b. Lavar las laminillas en dos cambios de etanol al 95% durante 1 minuto cada uno.
- c. Lavar las laminillas en dos cambios de etanol absoluto durante 2 minutos cada uno.
- d. Lavar la muestra en dos cambios de xilol durante 2 minutos cada uno.

7. Montaje

- a. Montar con un medio resinoso.

8. Resultados.

Las células se observan al microscopio con el núcleo color azul y el citoplasma de color rosado a rojo.

Tinción de Hematoxilina Fosfotúngstica

1. Desparafinación de las laminillas.

- a. Lavar las laminillas en dos cambios de xilol durante 3 minutos cada uno.
- b. Lavar las laminillas en dos cambios de etanol absoluto durante 3 minutos cada uno.
- c. Lavar las laminillas en dos cambios de etanol al 95% durante 3 minutos cada uno.
- d. Lavar las laminillas una vez en etanol al 70% durante 3 minutos.
- e. Lavar las laminillas en dos cambios de agua bidestilada durante 1 minuto cada uno.

2. Fijación

- a. Colocar las laminillas en dicromato ácido por 30min.
- b. Realizar un lavado en agua de grifo a través de 3 inmersiones.

3. Tinción

- a. Sumergir en permanganato ácido por 1 min.
- b. Realizar un lavado en agua de grifo a través de 3 inmersiones.

4. Diferenciación

- a. Sumergir en Ácido oxálico a través de 3 inmersiones rápidas.
- b. Enjuagar con agua del grifo en una inmersión rápida.

5. Tinción

- a. Colocar en la solución de tinción de PTAH a 60°C por 60 minutos.

6. Deshidratación

- a. Realizar 3 inmersiones rápidas en concentraciones crecientes de alcohol (96% -100%)
- b. Realizar 3 inmersiones rápidas en Etanol-Xilol
- c. Realizar 3 inmersiones rápidas en 2 cambios de Xilol

7. Montaje

- a. Montar con un medio resinoso.

Tinción de Wright-Giemsa

1. Desparafinación de las laminillas.

- a. Desparafinar las secciones a través de tres cambios de xileno, 3 minutos cada uno.
- b. Hidratar a través de dos cambios de alcohol al 100% y al 95%, 10 inmersiones en cada uno.

2. Post fijación

- a. Sumergir las laminillas de dos cambios de metanol 3 minutos cada uno.

3. Tinción

- a. Teñir en solución de Wright por 6 minutos.
- b. Teñir en la solución de trabajo fresca de Giemsa a 60° en estufa por 60 minutos.

4. Deshidratación

- a. Deshidratar en dos cambios de etanol al 95% y al 100%.
- b. Aclarar en tres cambios de xileno, 10 inmersiones en cada uno.

5. Montaje

- a. Montar con entellan.